



Búsqueda de nuevos reguladores de salida de mitosis: Hit1 y su papel en el control del ciclo celular.

Trabajo realizado por la Licenciada Ana Isabel de los Santos Velázquez, en el Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla y en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biomedicina.

Sevilla, 2017

Doctorando:

Ana Isabel de los Santos Velázquez

Director de la Tesis:

Fernando Monje Casas

Tutor de la Tesis:

Ralf Erik Wellinger

El trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-23436; BFU2013-43718-P), la Unión Europea (FEDER) y una Marie Curie International Reintegration Grant (PIRG04-GA-2008-239416).

ÍNDICE:

ABREVIATURAS.....	6
1. INTRODUCCIÓN:.....	9
1.1. EL CICLO CELULAR:.....	9
1.1.1. Regulación del ciclo celular:	11
1.1.1.1. Mecanismos de regulación de salida de mitosis en <i>S. cerevisiae</i> :.....	13
1.1.1.1.1. Ruta FEAR:	15
1.1.1.1.2. Ruta MEN:	18
1.1.2. Puntos de control del ciclo celular en <i>S. cerevisiae</i> :	19
1.2. EL NUCLEÓLO, COMPARTIMENTO CLAVE PARA EL CICLO CELULAR:.....	22
1.2.1. Biogénesis de ribosomas:	25
1.2.2. El complejo RENT:	29
1.3. CONDENSACIÓN CROMOSÓMICA:	31
1.4. UN NUEVO FACTOR DE ENSAMBLAJE DE snoRNPs C/D : <i>HIT1</i>	34
2. OBJETIVOS:	37
3. RESULTADOS:	38
3.1. La ausencia simultánea de los genes <i>HIT1</i> y <i>LTE1</i> conduce a letalidad sintética, que es rescatada por la eliminación adicional de <i>BFA1</i> :.....	38
3.2. La expresión y localización de <i>HIT1</i> se mantiene constante a lo largo del ciclo celular:	41
3.3. La sobreexpresión de <i>HIT1</i> determina problemas de viabilidad celular:.....	42
3.4. La ausencia de <i>HIT1</i> retrasa la salida de mitosis:	44
3.4.1. La ausencia de <i>HIT1</i> provoca un retraso en la liberación de Cdc14:.....	48
3.4.1.1. La ausencia de <i>RSA1</i> provoca termosensibilidad y letalidad sintética en combinación con la falta de <i>LTE1</i> :	52
3.4.1.2. La ausencia de <i>HIT1</i> provoca hipercondensación nucleolar:	53
3.5. La liberación deficiente de Cdc14 en células que carecen de <i>HIT1</i> puede rescatarse aliviando la hipercondensación nucleolar:.....	62
4. DISCUSIÓN:	67

4.1.	Los factores de ensamblaje de snoRNPs C/D Hit1 y Rsa1 son necesarios para el correcto control del ciclo celular:	67
4.2.	El ensamblaje de snoRNPs C/D y la maduración del ADNr interfieren con la condensación nucleolar:.....	69
4.3.	La condensación tardía del ADNr permite la liberación eficiente de Cdc14:.....	72
4.4.	La función de Hit1 está conservada evolutivamente:	74
5.	CONCLUSIONES:.....	77
6.	MATERIALES Y MÉTODOS:	78
6.1.	ORGANISMOS MODELO:.....	78
6.1.1.	Estirpes de <i>Escherichia coli</i> :	78
6.1.2.	Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	78
6.2.	REACTIVOS:.....	78
6.2.1.	Antibióticos:	78
6.2.2.	Drogas e inhibidores:	79
6.2.3.	Enzimas:	79
6.2.4.	Tampones y soluciones:	80
6.3.	MEDIOS DE CULTIVO:.....	82
6.3.1.	Medio de cultivo para bacterias:	82
6.3.2.	Medios de cultivo para levaduras:	82
6.4.	CONSERVACIÓN DE CEPAS Y ESTIRPES:.....	83
6.4.1.	Conservación de cepas bacterianas:.....	83
6.4.2.	Conservación de estirpes de levadura:	83
6.5.	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS:.....	84
6.5.1.	Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> (miniprep):	84
6.5.1.1.	Plásmidos:	84
6.5.2.	Extracción de ADN genómico de levadura:	84
6.6.	OBTENCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS MEDIANTE TRANSFORMACIÓN:.....	85
6.7.	OBTENCIÓN DE ESTIRPES DE LEVADURAS:.....	85
6.7.1.	Obtención de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante cruces genéticos:	85
6.7.2.	Obtención de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante transformación:	86
6.7.2.1.	Deleción y etiquetado de genes de levaduras:	87
6.7.2.2.	Electroforesis de ADN:	87

6.8.	ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR EN LEVADURAS:.....	88
6.9.	SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS EN LEVADURAS:.....	88
6.10.	ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR MEDIANTE ANÁLISIS DE GEMACIÓN:.....	89
6.11.	TÉCNICAS DE MICROSCOPIA:	90
6.11.1.	Análisis de la localización de proteínas fluorescentes en <i>S. cerevisiae</i> :	90
6.11.2.	Inmunofluorescencia (IF) para la visualización de proteínas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	91
6.11.2.1.	Preparación de esferoplastos:.....	92
6.11.2.2.	Preparación de anticuerpos para inmunofluorescencia:.....	93
6.12.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LEVADURAS:	93
6.12.1.	Extracción de proteínas de <i>S. cerevisiae</i> con ácido tricloroacético (TCA):.....	93
6.12.2.	Extracción de proteínas de <i>S. cerevisiae</i> con sosa (NaOH):	94
6.12.3.	Análisis Western (<i>Western blot</i> , WB):.....	94
6.13.	INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP):	95
6.13.1.	Análisis de los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa (qPCR):.....	96
6.14.	TABLAS:	97
	TABLA M1: ESTIRPES DE LEVADURAS UTILIZADAS:	97
	TABLA M2: PLÁSMIDOS USADOS:	99
	TABLA M3: ANTICUERPOS PARA IF:	99
	TABLA M4: ANTICUERPOS PARA WB:.....	100
	TABLA M5: CEBADORES PARA qPCR:	100
7.	BIBLIOGRAFÍA:.....	101
	AGRADECIMIENTOS:	121

ABREVIATURAS

ADNm	ADN mensajero
ADNr/ARNr	ADN ribosómico/ARN ribosómico
APC/C	Complejo Promotor de Anafase/Ciclosoma
ARN Pol	ARN polimerasa
BiFC	Análisis de complementación bimolecular de fluorescencia
CAK	Quinasa activadora de CDK
CDK	Quinasa dependiente de ciclinas
CF	Centro fibrilar
CFD	Componente fibrilar denso
CG	Componente granular
ChIP	Inmuno-precipitación de cromatina
Clbs	Ciclinas mitóticas tipo B
DDC	Punto de control de daños en el ADN
DIC	Contraste diferencial de interferencia
DO	Densidad óptica
ETS	Espaciadores externos (de las repeticiones de los loci del ADNr)
FEAR	Ruta de liberación temprana de Cdc14
FOA	Ácido 5-fluoroorótico
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
IF	Inmunofluorescencia
ITS	Espaciadores internos (de las repeticiones de los loci del ADNr)
Kb	Kilobase
MEN	Ruta de salida de mitosis
MTOCs	Centros organizadores de microtúbulos
n	Número de repeticiones
NLS	Señal de localización nuclear
NOR	Región organizadora nucleolar
NTS	Zona espaciadora no transcrita (de las repeticiones de los loci del ADNr)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PH	Contraste de fases
PR	Proteína ribosómica
Pre-ARN	Precursor del ARN
qPCR	PCR cuantitativa

RDN1	ADN ribosómico
RENT	Regulador del silenciamiento nucleolar y salida de telofase
RFB	Región de bloqueo de la horquilla de replicación
rpm	Revoluciones por minuto
SAC	Punto de control de ensamblaje del huso mitótico
SD	Desviación estándar
SEM	Error estándar de la media
snoARN	ARN pequeño nucleolar
snoRNP	Ribonucleopartícula pequeña nucleolar
snRNP	Ribonucleopartícula pequeña nuclear
SPB	Cuerpo polar del huso mitótico
SMC	Mantenimiento de la estructura cromosómica
SPOC	Punto de control de posicionamiento del huso mitótico
TIR	Región del inicio de la transcripción
Topo II	Topoisomerasa tipo II
WB	Western Blot

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. EL CICLO CELULAR:

El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen a la duplicación de las células. En organismos pluricelulares, este proceso es fundamental tanto para generar nuevas células durante el desarrollo embrionario como para reemplazar las células en un tejido adulto. El ciclo celular es un proceso altamente regulado, y alteraciones en el mismo pueden dar lugar a una proliferación celular descontrolada, aneuploidías o inestabilidad genómica, fenómenos que se asocian con la aparición de diversas patologías, como el cáncer. En eucariotas, el ciclo celular puede dividirse en dos etapas bien diferenciadas: interfase y mitosis. La interfase comprende dos fases de crecimiento celular (fases G1 y G2), entre las cuales se duplica el material genético (fase S). Por otro lado, en mitosis (fase M) se lleva a cabo un reparto equitativo del material genético duplicado entre la célula madre y la nueva célula hija, en un proceso conocido como segregación cromosómica. La mitosis finaliza con la citocinesis, que consiste en la separación física de los citoplasmas de las células resultantes del proceso de duplicación (Vermeulen et al., 2003). Para evitar errores en el reparto del material genético, a lo largo del ciclo celular debe producirse una precisa coordinación entre el crecimiento celular, la replicación del ADN y la segregación cromosómica. Esta coordinación es posible gracias a la existencia de diferentes mecanismos de vigilancia, denominados puntos de control o *checkpoints* mitóticos, cuya activación conduce a un bloqueo del ciclo celular que proporciona a las células tiempo para reparar aquellos problemas que puedan conducir a un reparto erróneo del material genético entre las células hijas generadas (Malumbres and Barbacid, 2009).

La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo modelo clave en estudios de genómica funcional. Se trata de un eucariota unicelular con una elevada tasa de crecimiento, de fácil cultivo y cuyo genoma está completamente secuenciado. Además, se disponen de múltiples herramientas moleculares para el estudio de su ciclo celular. Debido a que los mecanismos que rigen el ciclo celular se encuentran muy conservados durante la evolución, *S. cerevisiae* es un modelo especialmente apropiado, que proporciona un punto de partida de gran utilidad para el análisis de este proceso en eucariotas superiores.

S. cerevisiae presenta un patrón de división asimétrico, caracterizado por la generación de una gema que finalmente da lugar a la célula hija como consecuencia del crecimiento

polarizado de la célula madre (Amon, 1996) (Figura I1). El punto de control START, situado en la transición G1-S, impide que el ciclo celular se inicie hasta que la célula no haya alcanzado un tamaño adecuado (Hartwell et al., 1974). Una vez que las células sobrepasan este punto de control, entran irreversiblemente en el ciclo celular. Durante la fase S se produce la gemación, tiene lugar la duplicación de los cuerpos polares del huso (SPBs, del inglés *Spindle Pole Bodies*, el equivalente en levaduras a los centrosomas de eucariotas superiores) y, lo que define a esta etapa concreta del ciclo celular, se produce la replicación del material genético (Figura I1).

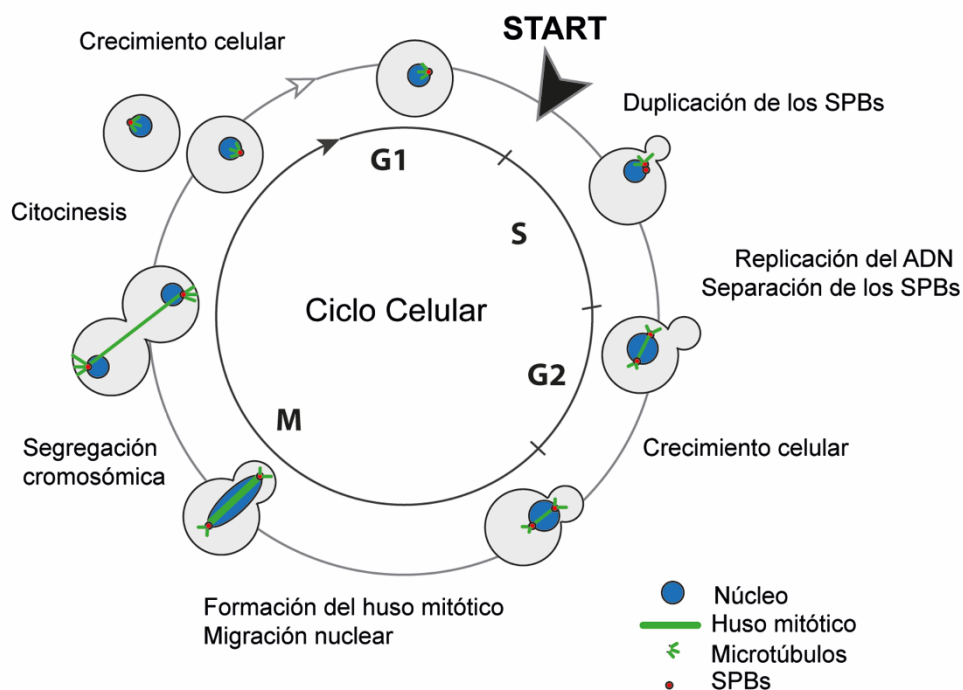


Figura I1. Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Una vez que la célula alcanza un tamaño adecuado sobrepasa el punto de control START y comienza el ciclo celular, que consta de cuatro fases diferenciadas: G1, S, G2 y M. Las fases G1 y G2 son de crecimiento celular. La replicación del ADN y la duplicación de los SPBs tienen lugar en la fase S. Durante la fase M se produce la distribución equitativa de los cromosomas entre las dos células generadas. El ciclo celular finaliza con la citocinesis. Adaptado de (Finn et al., 2012).

La mitosis se divide, a su vez, en cuatro fases distintas: profase, metafase, anafase y telofase. A diferencia de lo que ocurre en otros organismos eucarióticos más complejos, en *S. cerevisiae* la distribución del material genético durante la mitosis tiene lugar sin que se desintegre la membrana nuclear, proceso conocido como mitosis cerrada (McStay, 2016). Durante la profase, los cromosomas se encuentran unidos al huso mitótico, un haz antiparalelo de microtúbulos que emanan desde los Centros Organizadores de Microtúbulos (MTOCs, del inglés *Microtubule Organizing Centers*), es

decir, los SPBs en levaduras o los centrosomas en eucariotas superiores. En metafase, cada una de las dos cromátidas hermanas que constituye cada cromosoma replicado se une a microtúbulos que emanan de un polo distinto del huso mitótico, y los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial de la célula. De esta forma, en anafase, dichas cromátidas pueden distribuirse entre las dos células resultantes gracias a la separación de los MTOCs hacia polos opuestos de las mismas durante la elongación del huso mitótico. Por último, en telofase, tiene lugar el desensamblaje del huso. Una vez completada la distribución de los cromosomas, tiene lugar la citocinesis, durante la cual la célula hija separa su citoplasma de la célula madre a través de la contracción de un anillo de actina que se forma alrededor del cuello de la gemación (Hartwell et al., 1974; Herskowitz, 1988).

1.1.1. Regulación del ciclo celular:

El ciclo celular está gobernado por los mismos principios fundamentales, tanto en los eucariotas más simples, como las levaduras, como en organismos pluricelulares más complejos, como los humanos. Los principales componentes de la maquinaria de regulación del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, del inglés *Cyclin-Dependent Kinases*), una familia de proteínas quinasas muy conservadas en la evolución que se asocian con distintas subunidades reguladoras, denominadas ciclinas. La actividad y especificidad de sustrato de las CDKs oscila a lo largo del ciclo celular en base a su unión a distintas ciclinas (ciclinas de fase G1, de fase S o de fase M) (Nasmyth, 1996; Tyson et al., 2001; Tyson et al., 1995). Las ciclinas son proteínas cuyos niveles varían durante el ciclo celular, gracias a la regulación tanto de su transcripción como de su degradación (Kobayashi et al., 1992; Lees and Harlow, 1993). De esta manera, y puesto que la concentración de CDK a lo largo del ciclo celular se mantiene prácticamente constante, es la secuencia de aparición-destrucción de las distintas ciclinas y su unión con CDK lo que provoca la progresión y transición entre las distintas fases del ciclo (Nasmyth, 1996; Nurse, 1990) (Figura I2).

En células de mamífero, se han identificado al menos 9 CDKs distintas, así como 16 tipos de ciclinas, si bien no todas regulan la progresión del ciclo celular (Johnson and Walker, 1999). *S. cerevisiae* posee una única CDK (Cdc28) y tiene dos tipos de ciclinas: las ciclinas tipo N (Cln1, Cln2 y Cln3), presentes en la fase G1, y las ciclinas tipo B (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5, Clb6), presentes en las fases S y M (Fitch et al., 1992; Spellman et al., 1998; Tyers et al., 1993) (Figura I2).

	Ciclinas G1	Ciclinas fase S	Ciclinas mitóticas
<i>S. cerevisiae</i>	Cln1,Cln2,Cln3+Cdc28	Clb5,Clb6+Cdc28 (Clb1,Clb2,Clb3,Clb4+Cdc28)	Clb1,Clb2,Clb3,Clb4+Cdc28 (Clb5,Clb6+Cdc28)
<i>S. pombe</i>	puc1+cdc2	cig1,cig2+cdc2 (cdc13+cdc2)	cdc13+cdc2
Eucariotas superiores	CycD1,CycD2,CycD3+Cdk4,Cdk6 CycE+Cdk2	CycE+Cdk2 (?) CycA+Cdk2/Cdk1	CycB1,CycB2,CycB3+Cdk1 CycA+Cdk2/Cdk1

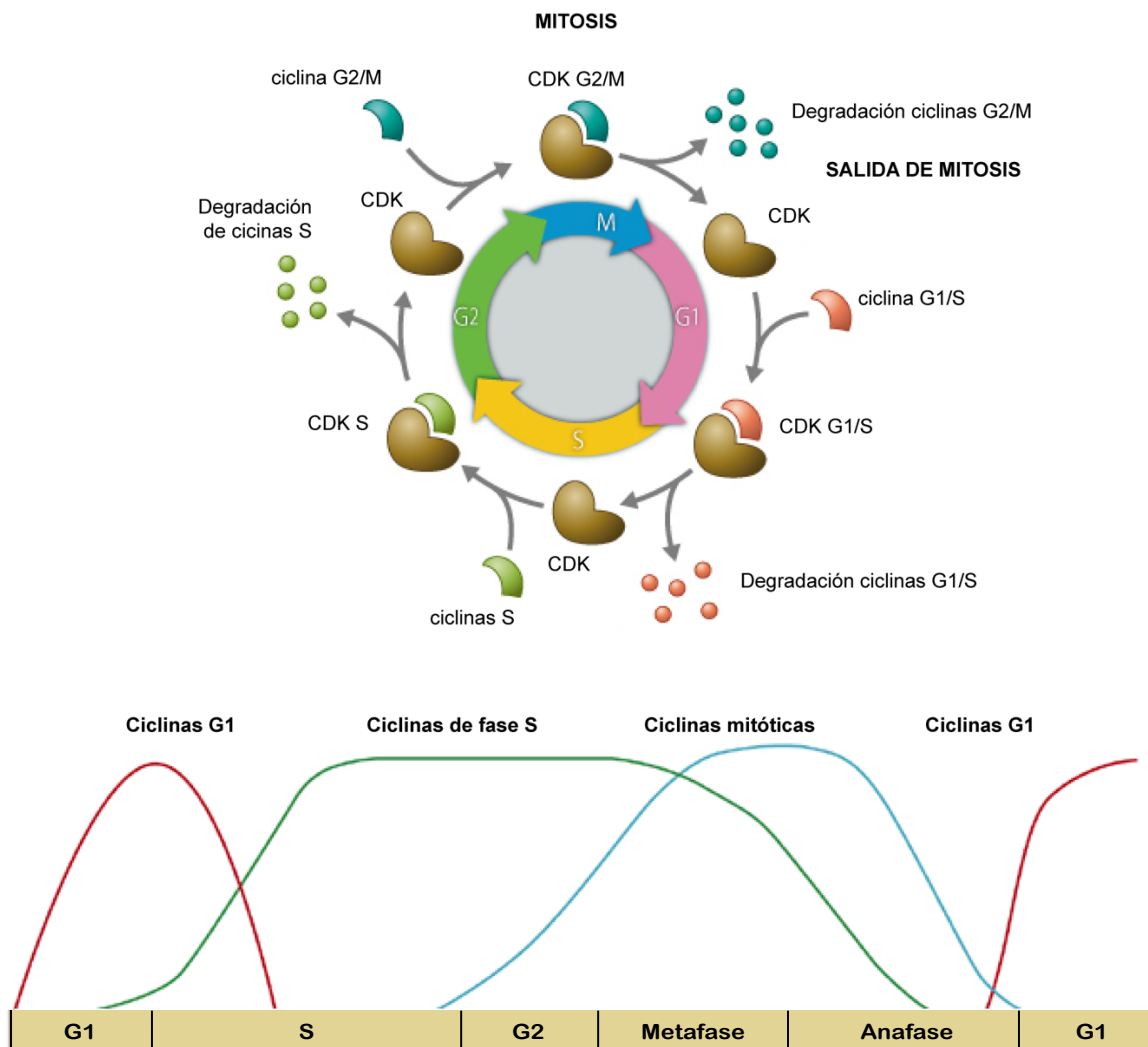


Figura I2. Tipos de ciclinas y progresión del ciclo celular en *S. cerevisiae*, *S. pombe* y eucariotas superiores. Las ciclinas de fase G1 se sintetizan al comienzo de esta fase y se destruyen en la transición G1-S. La expresión de las ciclinas de fase S promueve la duplicación del ADN durante las primeras etapas de la mitosis. Las ciclinas de fase S se destruyen en la transición metafase-anafase. Las ciclinas mitóticas alcanzan un pico de máxima actividad durante fase M y están implicadas en la entrada en mitosis y la segregación del material genético. La destrucción de las ciclinas de fase M al final de mitosis es esencial para la entrada en una nueva fase G1 del siguiente ciclo celular. Adaptado de (Bardin and Amon, 2001).

En *S. cerevisiae* el complejo CDK-Clb2 es el que muestra una mayor actividad quinasas durante mitosis (Grandin and Reed, 1993) y desempeña funciones esenciales para la

progresión a través de esta etapa, entre las que se encuentran promover la condensación del ADN, el ensamblaje del huso mitótico y la segregación del material genético (Jin et al., 2008). De hecho, la expresión exclusivamente de CDK-Clb2 en el triple mutante *clb1Δclb3Δclb4Δ* (carente del resto de ciclinas mitóticas) es suficiente para promover la progresión de la mitosis (Fitch et al., 1992).

La actividad de CDK, además de por la aparición y destrucción de las distintas ciclinas específicas de cada fase del ciclo celular, también se regula por fosforilación directa de la quinasa. Así, en la célula existen tanto inhibidores de los complejos CDK-ciclinas, como proteínas implicadas en su activación mediante la regulación de su estado de fosforilación, incluyendo las quinasas activadoras de CDK1 (CAKs, del inglés *CDK1-Activating Kinases*) (Booher et al., 1993; Kellogg, 2003; Lew, 2003; Ross et al., 2000; Rupes, 2002; Thuret et al., 1996).

1.1.1.1. Mecanismos de regulación de salida de mitosis en *S. cerevisiae*:

El proceso de salida de mitosis es la transición final del ciclo celular, que concluye el proceso de división de las células, y que viene determinada por la inactivación de CDK. La entrada en un nuevo ciclo celular requiere tanto de un descenso de los niveles de actividad CDK-ciclinas mitóticas, como de una reversión del estado de fosforilación de los sustratos fosforilados por estos complejos (Queralt and Uhlmann, 2008a). De este modo, la entrada a un nuevo ciclo celular se consigue gracias a la degradación de las ciclinas mitóticas y a la acumulación de Sic1, un inhibidor de los complejos CDK-Clbs (Knapp et al., 1996; Sullivan and Morgan, 2007; Toyn et al., 1997; Visintin et al., 1998).

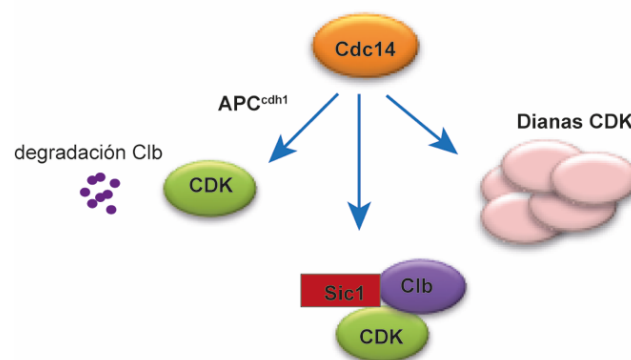


Figura I3. Representación esquemática de la actividad de Cdc14 en *S. cerevisiae*. La actividad de Cdc14 promueve la activación del APC/C^{Cdh1} degradando las ciclinas mitóticas y estabilizando a Sic1, que inhibe, a su vez, a los complejos CDK-ciclinas mitóticas. Además, Cdc14 desfosforila los

sustratos de CDK. Todo ello contribuye a que la salida de mitosis tenga lugar. Adaptado de (Bloom and Cross, 2007).

En el proceso de salida de mitosis juegan un papel fundamental tanto el Complejo Promotor de Anafase/Ciclosoma (APC/C) (Pesin and Orr-Weaver, 2008), como la fosfatasa Cdc14. La destrucción de las ciclinas mitóticas comienza en la transición metafase-anafase gracias a la actividad del complejo APC/C unido a su cofactor Cdc20 (Baumer et al., 2000; Wasch and Cross, 2002; Yeong et al., 2000), y concluye al final de mitosis, también gracias al complejo APC/C, pero en este caso unido a su subunidad reguladora Cdh1 (Schwab et al., 1997; Visintin et al., 1997). Cdc14, por otro lado, es responsable de la desfosforilación y activación de Cdh1 durante las últimas etapas de la mitosis (Jaspersen et al., 1999; Zachariae et al., 1998). Además, esta fosfatasa es responsable de la desfosforilación de multitud de dianas que han sido previamente fosforiladas por los complejos CDK-ciclinas mitóticas (Queralt and Uhlmann, 2008a; Stegmeier and Amon, 2004), lo que contribuye a la inactivación final de estas quinasas y determina, por tanto, la consiguiente salida de mitosis (Figura I3).

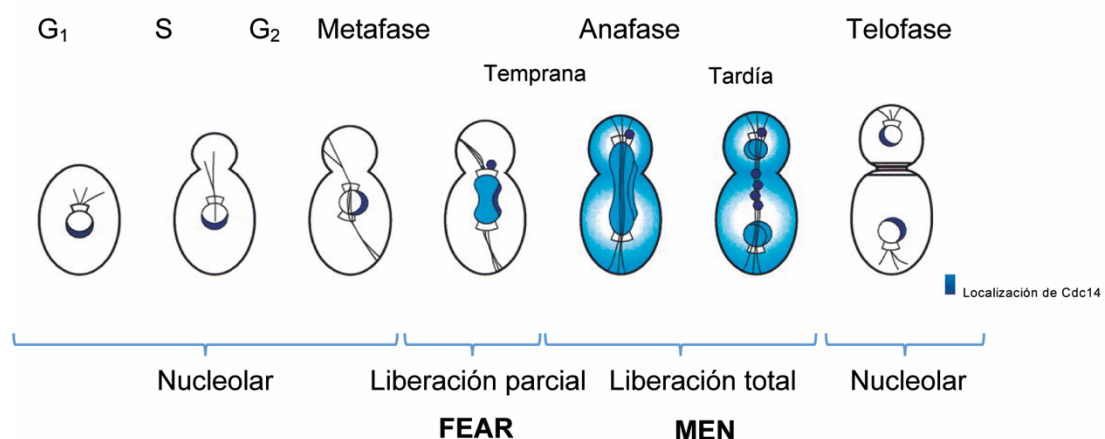


Figura I4. Localización de la fosfatasa Cdc14 a lo largo del ciclo celular en *S. cerevisiae*. Cdc14 permanece secuestrada en el nucléolo desde G₁ hasta metafase, unida a su proteína inhibidora Cfi1/Net1. La ruta FEAR induce la liberación de Cdc14 desde el nucléolo al núcleo en la transición metafase-anafase (liberación temprana o parcial de Cdc14). En anafase, la ruta MEN es esencial para la liberación citoplasmática de Cdc14 (liberación tardía o total de Cdc14), lo que permite la inhibición de la actividad CDK-ciclinas mitóticas al final de mitosis. Tras la citocinesis, Cdc14 es secuestrada de nuevo en el nucléolo de las células hijas. Adaptado de (D'Amours and Amon, 2004).

Los niveles de expresión de Cdc14 se mantienen prácticamente constantes a lo largo del ciclo celular (Wan et al., 1992). En su lugar, la actividad de esta fosfatasa se regula mediante el control de su localización subcelular (Figura I4) (Stegmeier and Amon, 2004). Cdc14 se mantiene secuestrada en el nucléolo desde G₁ hasta metafase debido

a su unión con la proteína inhibidora Cfi1/Net1 (Shou et al., 1999; Traverso et al., 2001; Visintin et al., 1999). En la transición metafase-anafase, Cdc14 pierde afinidad por su inhibidor, liberándose hacia el núcleo y, finalmente, en anafase, por todo el citoplasma de la célula (Shou et al., 1999; Visintin et al., 1999). En *S. cerevisiae*, la liberación de la fosfatasa Cdc14 está regulada por dos cascadas de señalización: la ruta FEAR (del inglés, *Cdc Fourteen Early Anaphase Release*) y la ruta MEN (del inglés, *Mitotic Exit Network*) (Dumitrescu and Saunders, 2002; Simanis, 2003; Stegmeier and Amon, 2004) (Figura I4).

1.1.1.1.1. Ruta FEAR:

La ruta FEAR permite una liberación temprana de la fosfatasa Cdc14 desde el nucléolo al núcleo durante la transición metafase-anafase (Figura I5). Esta liberación, aunque no es esencial para la salida de mitosis (las levaduras con mutaciones en esta ruta son viables, mostrando tan sólo un ligero retraso de 15-20 minutos en la liberación de Cdc14 (Rock and Amon, 2009; Stegmeier and Amon, 2004; Stegmeier et al., 2002)), es importante tanto para estabilizar el huso mitótico como para la segregación del ADN ribosómico (ADNr) y los telómeros (Pereira et al., 2002; Rock and Amon, 2009; Stegmeier and Amon, 2004; Stegmeier et al., 2002; Yellman and Roeder, 2015; Yoshida et al., 2002). Además, la liberación de Cdc14 desde el nucléolo mediante la ruta FEAR favorece la posterior liberación de Cdc14 al citoplasma a través de la ruta MEN. De este modo, se establece un bucle de retroalimentación positivo que conduce a la liberación eficiente de la fosfatasa al final de mitosis (Jaspersen and Morgan, 2000; König et al., 2010). FEAR es, por tanto, un regulador central de anafase, pues con la activación de esta ruta se facilita la segregación cromosómica y se promueve la salida de mitosis (D'Amours et al., 2004).

La asociación entre Cdc14 y su inhibidor Cfi1/Net1 en el nucléolo está regulada por distintas proteínas y depende de su estado de fosforilación. Algunos componentes de FEAR, tales como las proteínas separasa (Esp1), Slk19, Spo12, CDK-Clb1/2 y Cdc5, promueven la fosforilación de Cfi1/Net1 o de la propia fosfatasa Cdc14, facilitando así la liberación de Cdc14 (Liang et al., 2009a; Rock and Amon, 2009) y comportándose, de este modo, como reguladores positivos de la ruta (Faust et al., 2013) (Figura I5). Por el contrario, la proteína nucleolar Fob1 estabiliza la interacción entre Cdc14 y Cfi1/Net1 actuando, por tanto, como un regulador negativo de la ruta FEAR (Huang and Moazed, 2003; Shou et al., 1999; Stegmeier et al., 2004; Tomson et al., 2009).

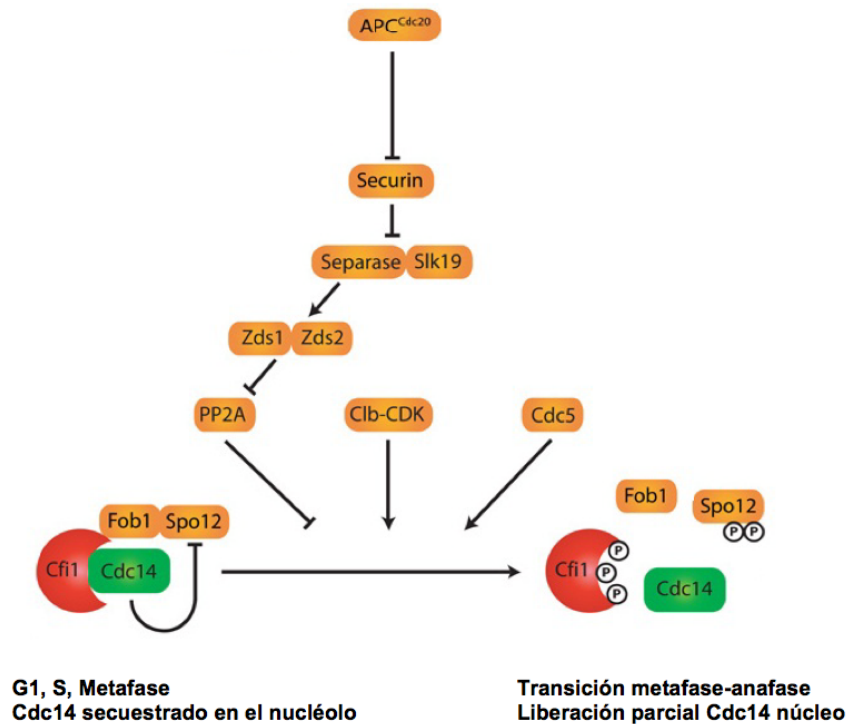


Figura I5: Señalización de la ruta FEAR. La caída de la actividad fosfatasa PP2A^{Cdc55}, la fosforilación de Spo12 y la actividad de las quinasas CDK-Clb1/2 y Cdc5 contribuyen a la fosforilación de Cfi1/Net1, lo que favorece la pérdida de afinidad entre esta proteína y Cdc14, induciéndose así la liberación inicial de la fosfatasa Cdc14 desde el nucléolo al núcleo en la transición metafase-anafase. Adaptado de (D'Amours and Amon, 2004).

La ruta FEAR consta de varias ramas de señalización paralelas (Rock and Amon, 2009; Stegmeier et al., 2002) (Figura I5). Una de estas ramas determina la inactivación de PP2A, una fosfatasa que estabiliza la interacción entre Cdc14 y su inhibidor Cfi1/Net1 durante la mayor parte del ciclo celular. La inhibición de la fosfatasa PP2A durante la transición metafase-anafase se debe a una cascada de señalización que comienza con el complejo APC/C^{Cdc20} (Figura I5). Este complejo, a través de su actividad ubiquitina ligasa, promueve la degradación de la proteína securina (Pds1), que se encuentra unida e inhibiendo a la proteasa separasa (Esp1) (Baskerville et al., 2008). Tras la eliminación de Pds1, la separasa permite la separación de las cromátidas hermanas debido a la degradación de una subunidad del complejo cohesina, que las mantiene unidas (Figura I6) (Ciosk et al., 1998; Hiloti et al., 2001; Stegmeier et al., 2002; Uhlmann et al., 1999). La separasa, además de para eliminar a las cohesinas, es necesaria para la elongación del huso en anafase (Baskerville et al., 2008). Esp1 forma un complejo con la proteína Slk19 (Sullivan et al., 2001; Sullivan and Uhlmann, 2003), y la separación de Slk19 de dicho complejo le permite dirigirse a la zona media del huso en anafase y estabilizarlo (Richmond et al., 2013). Adicionalmente, Slk19 es capaz de agrupar cinetocoros

(Richmond et al., 2013) y restringir la localización de Cdc14 al núcleo hasta que se produce el desensamblaje del huso mitótico (Faust et al., 2013). Finalmente, el complejo separasa-Slk19 también promueve la función de la proteína Zds1 y de su homólogo Zds2, proteínas citoplasmáticas que secuestran a Cdc55, la subunidad reguladora responsable de la localización y especificidad de sustrato de PP2A (Calabria et al., 2012; Queralt and Uhlmann, 2008b; Rossio and Yoshida, 2011). La retención de Cdc55 desde el núcleo inhibe la actividad fosfatasa de PP2A promoviendo, de este modo, la entrada en anafase y desencadenando así la activación completa de CDK en el núcleo (Queralt and Uhlmann, 2008b; Rossio et al., 2014) (Figura I5).

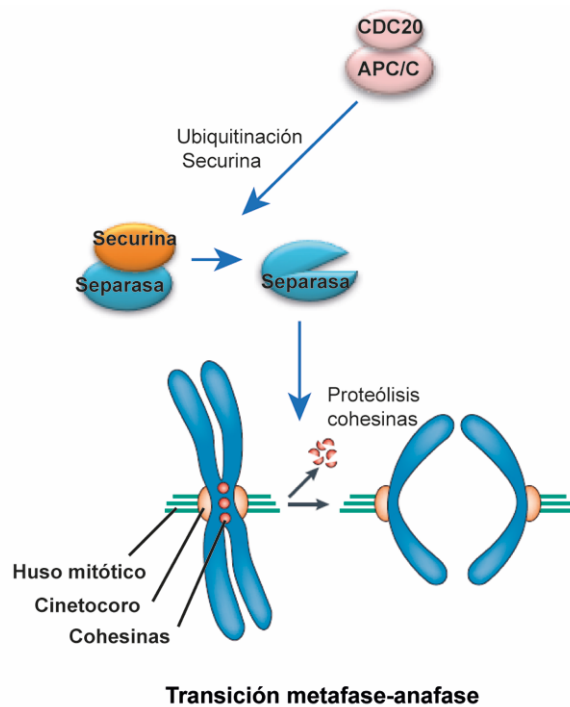


Figura I6: Separación de las cromátidas hermanas. La activación del Complejo Promotor de Anafase/Ciclosoma (APC/C) permite la separación de las cromátidas hermanas. Una vez que este complejo se activa, la securina (o Pds1) es ubiquitinada, lo que permite a la separasa degradar a las cohesinas que mantienen unidas a las cromátidas hermanas. Modificado de (Peters, 2006).

La disminución de la actividad fosfatasa de PP2A^{Cdc55}, por otro lado, permite que CDK-Clb1 y CDK-Clb2 fosforilen tanto a Cfi1/Net1 como a Spo12 (Azzam et al., 2004; Queralt et al., 2006), lo que promueve la liberación de Cdc14 desde el nucléolo y antagoniza los efectos inhibitorios de Fob1 (Figura I5). Se ha sugerido, además, que la fosforilación de Spo12 podría promover la liberación de Cdc14 por otros mecanismos adicionales (Tomson et al., 2009).

Finalmente, en la ruta FEAR también juega un papel importante la polo-quinasa Cdc5, que fosforila directamente a Cfi1/Net1, lo que contribuye a la liberación temprana de Cdc14. Para ello, se requiere de la actividad de CDK-Clb2 y de la separasa (Rodríguez-Rodríguez et al., 2016) (Figura I5).

1.1.1.1.2. Ruta MEN:

La ruta MEN es esencial para la liberación y el mantenimiento de la fosfatasa Cdc14 en el citoplasma al final de mitosis y, en consecuencia, también lo es para inhibir la actividad de los complejos CDK-ciclinas mitóticas y dar lugar, de esta forma, a la salida de mitosis (Stegmeier and Amon, 2004). En mutantes incapaces de activar la ruta MEN, la fosfatasa Cdc14, tras su liberación inicial por la ruta FEAR, vuelve a secuestrarse en el nucléolo, no pudiendo producirse la salida de mitosis. Por ello, estas células no son viables y presentan un fenotipo típico de células detenidas en anafase, con gemas grandes, dos núcleos separados y elevada actividad CDK (Jaspersen et al., 1998).

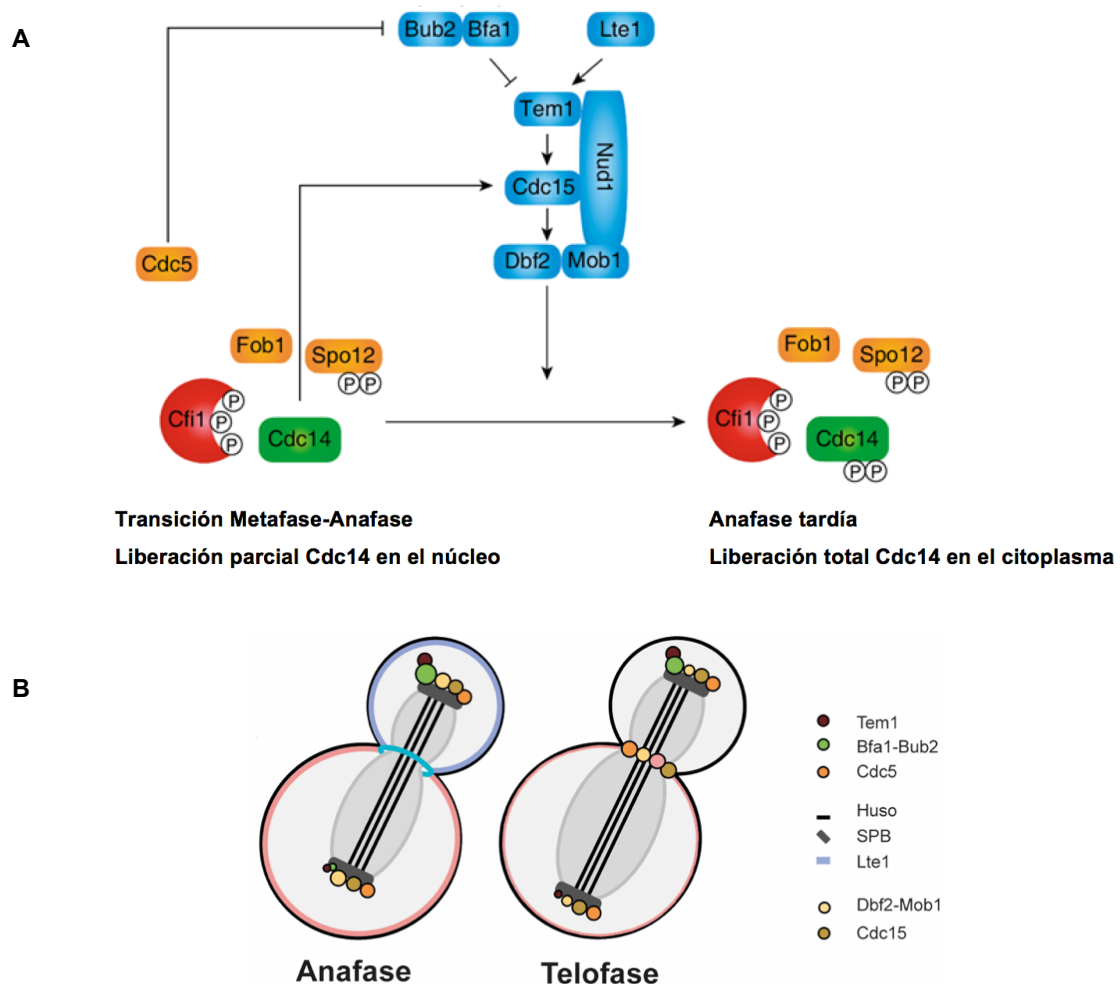


Figura 17. Señalización de la ruta MEN y localización de sus componentes. A) El complejo Bfa1-Bub2 regula negativamente a Tem1 durante la mayor parte del ciclo celular. Cdc5 fosforila e inhibe a Bfa1-Bub2 en anafase, lo que permite la activación de la ruta MEN. La mayoría de las proteínas de la ruta MEN se localizan en los SPBs gracias a la proteína de anclaje Nud1. La activación de Tem1 permite la localización y activación de la quinasa Cdc15 en estas estructuras. Cdc5 coopera, junto

con Tem1, en la regulación de la localización de Cdc15. Una vez en los SPBs, Cdc15 fosforila y activa a la quinasa Dbf2-Mob1, responsable de la fosforilación de Cdc14 al final de mitosis. En última instancia, la fosforilación de Cdc14 y Cfi1/Net1 permite la liberación de Cdc14 al citoplasma, lo que conduce a la inhibición de la actividad CDK-ciclinas mitóticas. Adaptado de (D'Amours and Amon, 2004). B) En anafase, el complejo Tem1 (Tem1-Bfa1-Bub2) se localiza asimétricamente en el SPB que entra en la célula hija. Las quinasas Cdc5, Cdc15 y Dbf2-Mob1 se localizan en ambos SPBs desde metafase hasta el final de mitosis, localizándose también en el cuello de la gemación durante la citocinesis. El activador Lte1 se localiza exclusivamente en el córtex de la célula hija durante mitosis. Adaptado de (Caydasi et al., 2010).

La señalización de la cascada MEN se inicia con la activación de Tem1 (Shirayama et al., 1994) (Figura I7), una pequeña GTPasa localizada en los SPBs, siendo dicha localización necesaria para que tenga lugar la salida de mitosis (Valerio-Santiago and Monje-Casas, 2011). La actividad de Tem1 está regulada positivamente por Lte1 (Falk et al., 2016; Segal, 2011), una proteína que se localiza de forma asimétrica en el córtex de la gema, y que promueve la actividad de la GTPasa cuando el SPB donde se carga Tem1 entra en la célula hija (Segal, 2011). Por otro lado, el complejo Bfa1-Bub2 actúa como un regulador negativo de Tem1 (Bardin et al., 2000; Falk et al., 2016; Geymonat et al., 2009; Ibrahim, 2015; Pereira et al., 2000). En anafase, el complejo Bfa1-Bub2 se fosforila e inhibe por la polo-quinasa Cdc5 (D'Aquino et al., 2005; Hu et al., 2001), permitiendo la activación de la ruta MEN (Figura I7). Una vez activa, Tem1 permite la activación y localización de la quinasa Cdc15 en los SPBs (Falk et al., 2016; Visintin and Amon, 2001). Cdc15, a su vez, fosforila a un componente estructural de la placa externa de estas estructuras, Nud1 (Gruneberg et al., 2000), lo que permite la unión y activación de la quinasa Dbf2 y su factor asociado, Mob1 (Mah et al., 2001; Rock et al., 2013; Visintin and Amon, 2001). Finalmente, la activación de Dbf2-Mob1 posibilita la fosforilación de residuos adyacentes a la secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Signal*) de Cdc14, lo que contribuye a su posterior liberación al citoplasma (Faust et al., 2013; Komarnitsky et al., 1998; Mohl et al., 2009) (Figura I7). Una vez finalizada la mitosis, la fosfatasa Cdc14 promueve la degradación de Cdc5 por Cdh1, lo que determina la reactivación del complejo Bub2-Bfa1, inhibiéndose de esta manera la señalización de MEN (Baskerville et al., 2008).

1.1.2. Puntos de control del ciclo celular en *S. cerevisiae*:

Para asegurar la viabilidad celular, debe existir una perfecta coordinación entre las distintas etapas del ciclo que permita la correcta duplicación de la información genética y su fiel transmisión a las células hijas durante la división celular. Con este fin, la

progresión del ciclo está controlada por distintos puntos de control, también llamados *checkpoints* mitóticos. Estos puntos de control detectan tanto errores producidos durante las distintas etapas del ciclo celular como daños en el material genético, y su activación conduce a un bloqueo o retraso del ciclo, permitiendo a las células reparar los errores detectados para asegurar que cada etapa del ciclo se complete correctamente antes de continuar con la siguiente (Malumbres and Barbacid, 2009). En *S. cerevisiae*, los principales mecanismos de vigilancia que garantizan la estabilidad genómica son el denominado punto de control de daños en el ADN (DDC; del inglés *DNA Damage Checkpoint*), el punto de control de ensamblaje del huso mitótico (SAC; del inglés *Spindle Assembly Checkpoint*) y el punto de control de posicionamiento del huso mitótico (SPOC; del inglés *Spindle Position Checkpoint*) (Ciccía and Elledge, 2010; Harrison and Haber, 2006; Lew and Burke, 2003).

La activación del DDC facilita la reparación de daños en el genoma mediante el bloqueo o ralentización de la progresión del ciclo celular. Las lesiones sufridas en el ADN pueden deberse tanto a factores endógenos (asociados al propio metabolismo celular, o a errores durante los procesos de replicación, transcripción, reparación o segregación cromosómica), como exógenos (la radiación ultravioleta, la radiación ionizante o compuestos ambientales) (Ciccía and Elledge, 2010; Harrison and Haber, 2006).

Durante la división celular, para garantizar una distribución correcta del material genético, es preciso, por otro lado, que los cinetocoros de todas las cromátidas hermanas se unan a microtúbulos que emanan desde polos opuestos de la célula (biorientación cromosómica o unión anfitélica) (Tanaka et al., 2005; Walczak et al., 2010). La falta de unión de un solo cinetocoro a los microtúbulos del huso conduce a la activación del SAC, que inhibe la activación del APC/C a través del secuestro de su subunidad reguladora Cdc20, provocando, de este modo, un bloqueo en metafase (Jin et al., 2016; Schibler et al., 2016). Adicionalmente, el SAC colabora con la quinasa Ipl1 para garantizar, no sólo la unión de los cromosomas al huso, sino también la correcta biorientación de las cromátidas hermanas (Musacchio and Salmon, 2007). Las uniones anfitélicas permiten que se ejerza tensión sobre los cinetocoros como resultado del empuje de los microtúbulos desde ambos polos del huso (Jin et al., 2016). Cuando las uniones cinetocoro-microtúbulo no son correctas (uniones monotéticas, merotéticas o sintéticas), Ipl1 es capaz de detectar la falta de tensión en el huso y desestabiliza estas uniones, generando cinetocoros vacíos susceptibles de activar el SAC (Jin et al., 2016; Muñoz-Barrera et al., 2015; Pinsky et al., 2006) (Figura I8). El SAC se mantiene activo,

bloqueando las células en metafase, hasta que se establece la unión anfitélica de todos los cromosomas al huso mitótico.

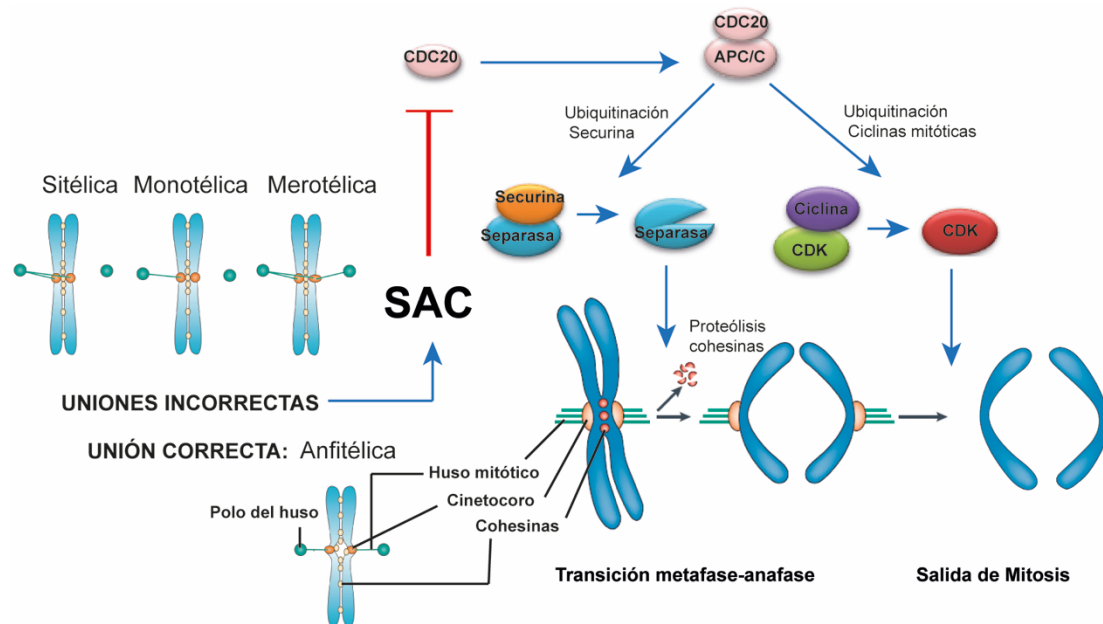


Figura I8: Checkpoint de ensamblaje del huso mitótico en *S. cerevisiae*. Para una correcta distribución del material genético, se precisa que todos los cinetocoros estén unidos a microtúbulos. La falta de unión de los cromosomas al huso activa el *checkpoint* de ensamblaje del huso (SAC). Por otro lado, junto con Ipl1, el SAC también se encarga de corregir uniones incorrectas de los cromosomas al huso que no garantizan la biorientación de las cromátidas hermanas (uniones monotéticas, merotéticas o sintéticas) y que, por tanto, provocan una falta de tensión en el huso. El SAC bloquea a las células en metafase mediante la inhibición de Cdc20, confiriendo a las células más tiempo para que se establezcan las uniones microtúbulo-cinetocoro correctas. Adaptado de (Peters, 2006; Tanaka et al., 2005).

Finalmente, en anafase, cuando el huso mitótico no se encuentra alineado con respecto al eje que determinan la célula madre y la célula hija, se activa el SPOC, desencadenando una cascada de señalización que determina un bloqueo del ciclo celular en esta fase del ciclo (Hu et al., 2001; Wang et al., 2000) (Figura I9). En células con el huso mitótico incorrectamente posicionado, tras la activación del SPOC, la quinasa Kin4 y las proteínas Bfa1-Bub2 se localizan en ambos SPBs de forma simétrica (Chan and Amon, 2010; D'Aquino et al., 2005; Fraschini et al., 2008; Molk et al., 2004; Pereira et al., 2000; Pereira and Schiebel, 2005), donde Kin4 fosforila a Bfa1, impidiendo de este modo la fosforilación inhibitoria de Bfa1-Bub2 por Cdc5 (D'Aquino et al., 2005; Maekawa et al., 2007; Pereira and Schiebel, 2005). Esto permite que Bfa1 se mantenga hipofosforilada y activa, garantizándose así una inhibición de la salida de mitosis (Hu et al., 2001; Wang et al., 2000) (Figura I9). Esta inhibición de la salida de mitosis es adicionalmente facilitada porque la fosforilación de Bfa1 por Kin4 promueve su exclusión, y por ende la de Tem1, de los SPBs (D'Aquino et al., 2005).

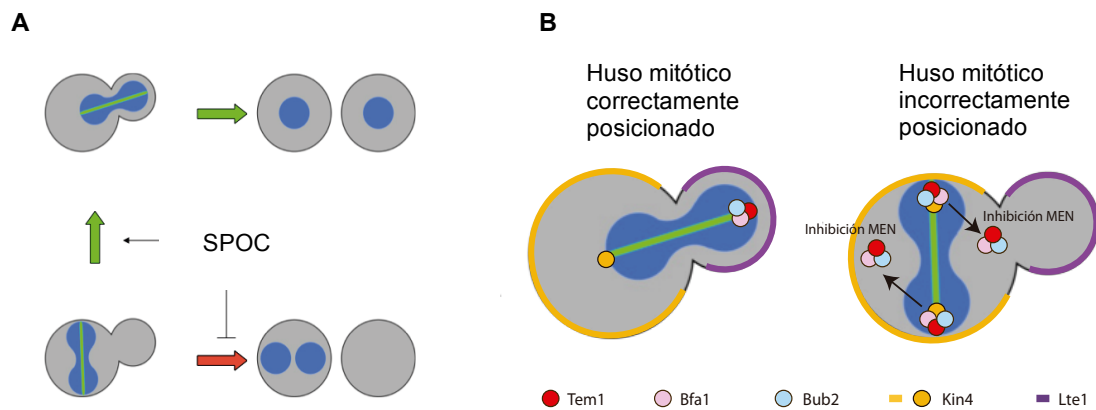


Figura I9: Checkpoint de posicionamiento del huso mitótico en *S. cerevisiae*. A) Si el huso no se alinea correctamente con respecto al eje célula madre-célula hija, los componentes centrales del *checkpoint* de posicionamiento del huso (SPOC) promueven la difusión de una señal inhibitoria que bloquea el ciclo en anafase, proporcionando a la célula más tiempo para lograr el alineamiento correcto del huso (Ibrahim, 2015), y garantizando así un reparto equitativo del material genético. B) Localización de los componentes de la ruta MEN tras la activación del SPOC. En células con los husos mitóticos incorrectamente elongados dentro de la célula madre, Bfa1-Bub2 y la quinasa Kin4 se sitúan en ambos SPBs. La fosforilación de Bfa1 por la quinasa Kin4 promueve la dinámica de disociación de Bfa1 de los SPBs e impide su fosforilación inhibitoria por Cdc5. Adaptado de (Caydasi et al., 2012).

De forma interesante, las proteínas Bfa1-Bub2 no sólo son importantes para el funcionamiento del SPOC, sino también para garantizar la funcionalidad del DDC y del SAC. Concretamente, en el caso del DDC, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que la inhibición de la ruta MEN por Bfa1-Bub2 es requerida de forma específica tras la generación de daños en los telómeros (Valerio-Santiago et al., 2013). El papel fundamental que juega la inhibición de la ruta de salida de mitosis en todos estos mecanismos de vigilancia resalta la importancia de una regulación precisa de esta ruta para el correcto control del ciclo celular.

1.2. EL NUCLEOLO, COMPARTIMENTO CLAVE PARA EL CICLO CELULAR:

La célula eucariota tiene dos compartimentos claramente diferenciados: el citoplasma y el núcleo. Si bien ambos compartimentos se encuentran altamente organizados en orgánulos perfectamente definidos, en el núcleo, a diferencia de lo que ocurre en el citoplasma, estos no están delimitados por membranas. El núcleo engloba al material genético, y en él tienen lugar procesos celulares tan importantes como la replicación, la transcripción, la reparación del ADN, la biogénesis de ribosomas o el procesamiento del

pre-ARN ribosómico (pre-ARNr) (Rosete et al., 2007). Estos dos últimos eventos se llevan a cabo, concretamente, en el nucléolo, un orgánulo que consta de los siguientes componentes (Figura I10):

- El centro fibrilar (CF): comprende la región más interna del nucléolo y en él se encuentran localizadas múltiples copias de los genes que codifican el pre-ARNr, así como la ARN polimerasa I (Pol I) (Lam et al., 2005; Melese and Xue, 1995; Scheer and Rose, 1984).
- El componente fibrilar denso (CFD): se encuentra localizado alrededor del CF y es donde tienen lugar los primeros estadios del procesamiento de los ARNr (Hernandez-Verdun, 2006; Lam et al., 2005).
- El componente granular (CG): abarca la región más externa del nucléolo, lugar donde se realiza el ensamblaje de las partículas pre-ribosomales destinadas a ser transportadas al citoplasma, y donde se concentran las proteínas que participan en los estadios intermedios y tardíos de la biogénesis de los ribosomas (Derenzini et al., 2006; Lam et al., 2005; Lo et al., 2006; Melese and Xue, 1995; Raska et al., 2006; Rosete et al., 2007; Thiry and Lafontaine, 2005; Trumtel et al., 2000).

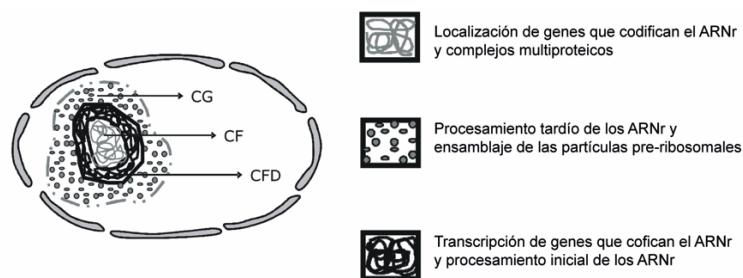


Figura I10: Morfología nucleolar. Se distinguen los siguientes componentes subcelulares: centro fibrilar (CF), donde residen los genes del ADNr; componente fibrilar denso (CFD), lugar de maduración de los pre-ARNr; y componente granular (CG), donde se ensamblan las partículas pre-ribosomales. Modificado de (Rosete et al., 2007).

Algunos autores, sin embargo, proponen que la estructura del nucléolo es aún más compleja que la aquí descrita, abarcando otros componentes adicionales (Derenzini et al., 2006; Raska et al., 2006; Rosete et al., 2007).

En *S. cerevisiae*, el nucléolo ocupa aproximadamente una cuarta parte del volumen total del núcleo (Bystricky et al., 2004; Leger-Silvestre et al., 1999), y está compuesto por un conjunto de 150-200 copias repetidas y ordenadas en tándem de ADN ribosómico (ADNr), cada una de las cuales tiene un tamaño de 9,1 Kb (Kobayashi et al., 1998; Petes and Botstein, 1977; Shou et al., 2001; Trumtel et al., 2000) (Figura I11). Este conjunto

de repeticiones de ADN_r se aloja en el brazo largo del cromosoma XII, el más extenso del genoma de la levadura, con más de 1Mb de ADN_r (*RDN1*) (Machin et al., 2005). La conformación espacial que adopta el cromosoma XII es destacable, pues se encuentra separado y extendido hacia el exterior del genoma, alejado del resto de cromosomas (Duan et al., 2010) (Figura I12). Según varios autores, esta conformación es fundamental para la organización general del genoma, pues el modelado de la estructura nucleolar modifica la estructura genómica, e interviene en la regulación de la expresión génica (O'Sullivan et al., 2013). La modificación de la estructura nucleolar, así como la variación en el número de repeticiones del ADN_r, ya sea debido a factores ambientales o del ciclo celular (Boisvert et al., 2007; Raska et al., 2006), puede provocar una retención más fuerte o más débil de ciertas proteínas que se secuestran en el nucléolo, como consecuencia de cambios espaciales de sus sitios de unión. De esta manera, el nucléolo contribuye, de forma directa o indirecta, a modificar la organización nuclear (O'Sullivan et al., 2013). El nucléolo es un compartimento muy dinámico cuyo tamaño, número y estructura varía según el tipo celular y el estado metabólico de la célula (Raska et al., 2006; Sirri et al., 2008; Trumtel et al., 2000).

La formación y organización espacial del nucléolo se debe al confinamiento de la maquinaria de transcripción y maduración en torno a la llamada región organizadora nucleolar (NOR del inglés *Nucleolar Organizer Region*), que engloba las repeticiones del ADN_r. Este confinamiento depende del estado de actividad de los genes ribosomales (Trumtel et al., 2000), de manera que para mantener la estructura de este orgánulo, se necesita la transcripción de los genes que codifican el ARNr (Panse et al., 1999; Raska et al., 2006; Scheer and Hock, 1999). La inhibición de la transcripción, así como el bloqueo de la maduración de los ribosomas, provocan defectos nucleolares relacionados con su morfología o segregación (Trumtel et al., 2000).

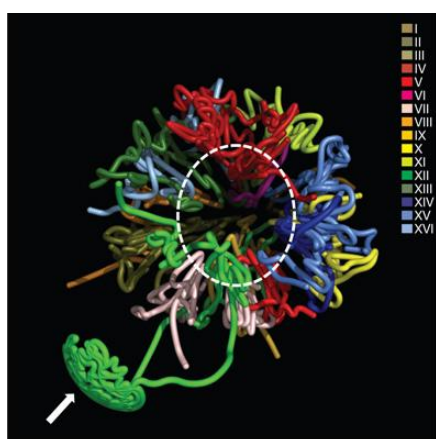


Figura I11: Organización del genoma en *S. cerevisiae*.

Los cromosomas del genoma de *S. cerevisiae* no se encuentran distribuidos al azar, sino que presentan una estructura tridimensional jerárquica que facilita la transcripción de ciertos genes y la replicación del genoma en su conjunto. Destaca la conformación del cromosoma XII (verde), que se extiende hacia fuera del resto del genoma, contiene las repeticiones del ADN_r y abarca al nucléolo, el cual se señala en la imagen con una flecha blanca (Duan et al., 2010).

Si bien la función principal del nucléolo es la biogénesis de ribosomas y el procesamiento del pre-ARNr, este orgánulo tiene otras funciones fundamentales. Así, en *S. cerevisiae*, juega un papel esencial en la regulación del ciclo celular, ya que es el compartimento donde se confina Cdc14, que, como se ha comentado anteriormente, es la proteína que promueve la salida de mitosis en este organismo.

1.2.1. Biogénesis de ribosomas:

Los ribosomas son complejos macromoleculares que constituyen el núcleo principal de la maquinaria de traducción en todos los seres vivos. Estos complejos están formados por ARN ribosómico (ARNr) y proteínas ribosómicas (PRs), y realizan dos funciones esenciales: la descodificación del mensaje genético y la síntesis de proteínas (Warner, 1999). Los ribosomas están constituidos por dos subunidades: la mayor, que en eucariotas tiene un coeficiente de sedimentación 60S; y la subunidad menor, de 40S. Concretamente, en *S. cerevisiae* la subunidad 60S está constituida por 46 PRs y tres ARNr (25S, 5,8S y 5S), mientras que la subunidad 40S está formada por 33 PRs y el ARNr 18S (Planta and Mager, 1998). En el nucléolo, los ARNr 18S, 5,8S y 25S son transcritos por la ARN polimerasa I (Pol I) como un precursor 35S, que se procesa secuencialmente dando lugar a los ARNr maduros de las subunidades 40S y 60S (French et al., 2003; Kos and Tollervey, 2010; Warner, 1999) (Figura I12). Sin embargo, el ARNr 5S es transcrito por la ARN polimerasa III (Pol III) en el núcleo, de manera independiente y en dirección opuesta, incorporándose a la subunidad 60S durante su biogénesis (Zhang et al., 2007) (Figura I12).

En eucariotas, la biogénesis de ribosomas está muy conservada tanto estructural como funcionalmente, siendo un proceso enormemente dinámico en el que se producen multitud de reordenamientos estructurales (Woolford and Baserga, 2013). Durante la formación de estos complejos macromoleculares, tiene lugar el procesamiento de los pre-ARNr y el ensamblaje de las PRs, eventos facilitados por numerosos factores de ensamblaje que dan lugar, progresivamente, a las distintas partículas pre-ribosómicas. Se trata de un proceso que, fundamentalmente, tiene lugar en el nucléolo, por lo que las partículas pre-ribosómicas transitan desde este orgánulo al nucleoplasma y, de aquí, al citoplasma (Gleizes et al., 2001). Del mismo modo, muchas PRs sintetizadas en el citoplasma deben ser importadas al nucléolo para unirse con los pre-ribosomas, facilitando su ensamblaje, su transporte (Bassler et al., 2001; Gadal et al., 2001; Tschochner and Hurt, 2003) y protegiendo a las subunidades maduras 60S y 40S de la

degradación (Poll et al., 2009). De esta manera, existen muchas moléculas que, aun no formando parte de las subunidades ribosómicas maduras, actúan en el proceso de biogénesis de ribosomas (Nissan et al., 2002; Schafer et al., 2003), pues ayudan a establecer una ruta de plegamiento adecuada para el ARNr. Gracias a estas proteínas, se incorporan o disocian a las partículas pre-ribosómicas los factores y PRs precisos en cada caso, previniéndose la formación de estructuras no apropiadas y estabilizando las estructuras correctas, garantizándose la síntesis de ribosomas funcionales.

Cromosoma XII *S. cerevisiae*

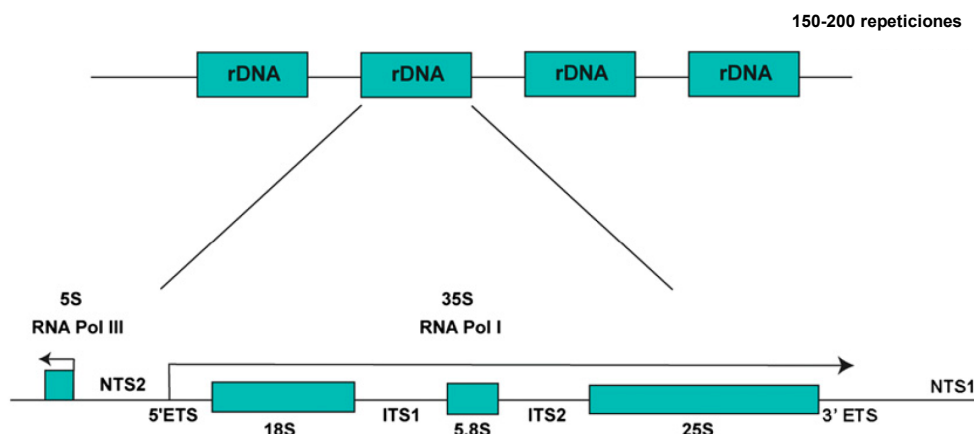


Figura I12: Representación de la organización de los loci del ADNr en *S. cerevisiae*. Las repeticiones del ADNr se alojan en el cromosoma XII en *S. cerevisiae*. Los ARNr maduros 18S, 5,8S y 25S proceden de un solo precursor (35S) que es transcrito por la ARN polimerasa I. El ARNr 5S, sin embargo, se transcribe por la ARN polimerasa III. Existen, además, dos espaciadores externos (5' ETS y 3' ETS) y dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2), estando el locus 5S separado del 35S mediante otros dos espaciadores que no se transcriben (NTS1 y NTS2). Adaptado de (Trumtel et al., 2000).

Entre las moléculas que no forman parte de los ribosomas funcionales maduros, aunque su acción es necesaria para su síntesis, se encuentran los factores de ensamblaje de los ribosomas, entre los que se incluyen las ribonucleopartículas pequeñas nucleolares (snoRNPs, del inglés, *small nucleolar RiboNucleoParticles*). Las snoRNPs son complejos ribonucleoproteicos formados por ARNs pequeños nucleolares (snoARNs, de *small nucleolar ARNs*), cuya función es la de unirse y servir de soporte al pre-ARNr para que pueda ser modificado posteriormente (Balakin et al., 1996; Kiss, 2002; Watkins and Bohnsack, 2012). En *S. cerevisiae*, podemos distinguir dos familias de snoRNPs: la familia H/ACA y la familia C/D (Balakin et al., 1996; Kiss, 2002; Watkins and Bohnsack, 2012), cuyas diferencias radican tanto en los motivos estructurales que presentan sus snoARNs, como en las modificaciones que llevan a cabo sobre el pre-ARNr (Woolford and Baserga, 2013) (Figura I13). Así, las snoRNPs H/ACA están compuestas por dos

horquillas unidas por una cadena sencilla (motivo H) y un motivo ACA en el extremo de la molécula del snoARN, y realizan la conversión de uridinas en pseudouridinas por isomerización. Por otro lado, las snoRNPs C/D presentan motivos C/D y C'/D' en su snoARN y metilan los nucleótidos en la posición 2'-OH de sus ribosas (Karbstein and Doudna, 2006; Kiss-Laszlo et al., 1996). Las snoRNPs C/D de *S. cerevisiae*, en concreto, están constituidas por un solo snoARN y cuatro proteínas centrales: Nop1, Nop56, Nop58 y Snu13 (Lafontaine and Tollervey, 1999, 2000; Watkins et al., 1998; Watkins et al., 2000) (Figura I14), siendo Nop1 la metiltransferasa que cataliza la modificación nucleotídica (Woolford and Baserga, 2013).

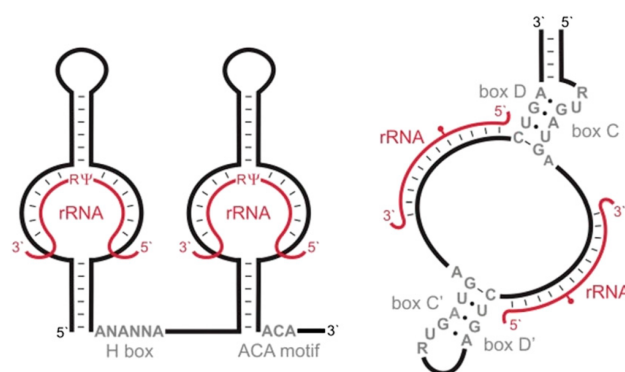


Figura I13: Esquema de las familias de snoARNs en *S. cerevisiae*. La familia H/ACA se encuentra representada a la izquierda, y se caracteriza porque el snoARN presenta un dominio H/ACA. La familia C/D está representada a la derecha, y en este caso se observan los motivos C/D y C'/D' propios de esta familia de snoARN. Los snoARNs se representan en negro, mientras que los residuos que son modificados se indican en rojo, señalándose Ψ para los pseudouridinados, y círculos rojos para los metilados (Watkins and Bohnsack, 2012; Woolford and Baserga, 2013).

La biogénesis de snoRNPs es un proceso complejo que engloba la transcripción y maduración de snoARNs, la síntesis e importe nuclear de las proteínas centrales, y el ensamblaje de los distintos componentes anteriores en la ribonucleopartícula definitiva. Para la biogénesis de las snoRNPs C/D, además de los factores ya comentados presentes en la molécula madura, se requiere el complejo R2TP, constituido por dos helicasas hexaméricas (Rvb1 y Rvb2) y las proteínas Tah1 y Pih1 (Machado-Pinilla et al., 2012; McKeegan et al., 2007) (Figura I14). Junto a estos factores, la proteína Rsa1 es clave en el reclutamiento de las pre-snoRNPs (Boulon et al., 2008), e interacciona con Pih1, Rvb1-Rvb2 y con las proteínas centrales de la RNP (Boulon et al., 2008; McKeegan et al., 2007) (Figura I14). Rsa1 y los componentes del complejo R2TP, cooperan juntos para conformar el andamiaje donde se ensamblan las snoRNPs (McKeegan et al., 2009) (Figura I14).

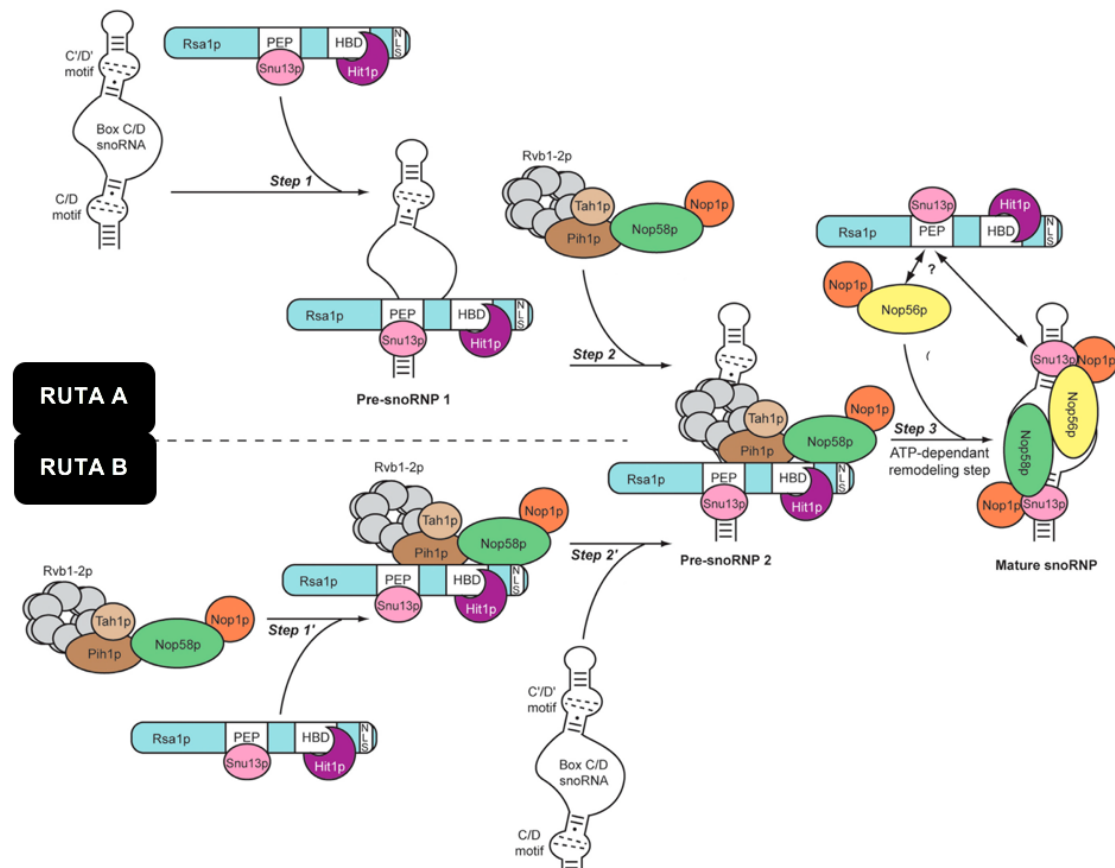


Figura I14: Modelo para la ruta de ensamblaje de snoRNP C/D. Las partículas ARN-Snu13-Nop58 y ARN-Snu13-Nop56-Nop1, nucleadas respectivamente en los motivos C/D y C'/D', se encuentran unidas en la snoRNP madura (Lin et al., 2011). Podemos distinguir dos vías alternativas de ensamblaje. En la primera, el snoARN es la diana del complejo Snu13-Rsa1-Hit1 (ruta A). En la segunda vía, se parte del ARN libre de complejos (ruta B). El sitio de unión de Snu13 (PEP), el sitio de unión de Hit1 (HBS) y la localización de la señal nuclear (NLS) forman parte funcional del extremo C-terminal de Rsa1. Modificado de (Rothe et al., 2014).

El procesamiento y las modificaciones que sufren los pre-ARNr pueden ser co-transcripcionales (Woolford and Baserga, 2013), de modo que los nucleótidos modificados se encuentran en los ARNr maduros. Dichas modificaciones sirven para optimizar la estructura del ARNr (Decatur and Fournier, 2002) y hacen posible la obtención de ribosomas maduros y eficientes (Baxter-Roshek et al., 2007; Liang et al., 2009b). En *S. cerevisiae*, la depleción de proteínas importantes asociadas a la modificación del pre-ARNr afecta a la biogénesis de ribosomas, así como al crecimiento celular, pudiendo llegar la modificación incorrecta del pre-ARNr a determinar la inviabilidad celular. El ensamblaje de ribosomas es un proceso altamente regulado, ya que la pérdida completa de función de la mayoría de los factores de ensamblaje y PRs son letales en levaduras (Woolford and Baserga, 2013).

La biosíntesis de ribosomas precisa buena parte de los recursos de la célula, tanto para su fabricación macromolecular como para su transporte, estando las tres ARN polimerasas involucradas en este proceso. Pol I y Pol III transcriben el ARNr, mientras que el ARNm que codifica las RPs y los factores de ensamblaje son transcritos producidos por Pol II (Woolford and Baserga, 2013). La biogénesis de ribosomas implica a muchas moléculas, siendo la síntesis del ARNr, y no de las PRs, el factor limitante en este proceso (Chedin et al., 2007; Lam et al., 2007). Por esta razón, los genes que codifican los ARNr se encuentran en alto número de copias en la mayoría de los eucariotas (Ide et al., 2010). La síntesis del ARNr está regulada a nivel de la iniciación de la transcripción (French et al., 2003) y la elongación, así como por la proporción de repeticiones del ARNr activas e inactivas (Woolford and Baserga, 2013).

1.2.2. El complejo RENT:

En la levadura de gemación, las proteínas Cfi1/Net1, Sir2 y Cdc14 constituyen el denominado complejo RENT (del inglés, *REgulator of Nucleolar silencing and Telophase exit*) (Figura I15), que controla la salida de mitosis, el silenciamiento nucleolar y mantiene la estructura del nucléolo (Shou et al., 2001; Tollervey et al., 1993).

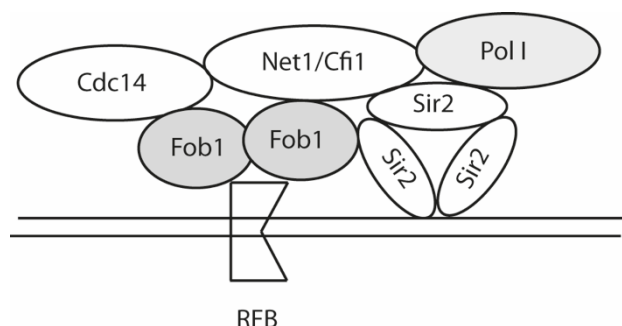


Figura I15: Representación esquemática del complejo RENT. El complejo RENT está compuesto por las proteínas Cfi1/Net1, Cdc14 y Sir2. Normalmente, este complejo se encuentra anclado al nucléolo por la proteína Fob1 al RFB (región de bloqueo de la horquilla de replicación). Modificado de (Bairwa et al., 2010).

El complejo RENT se encuentra anclado por medio de Cfi1/Net1 y Sir2 al nucléolo, principalmente en la región NTS1 (del inglés, *Non Transcribed Sequence*), que coincide con la región de bloqueo de la horquilla de replicación (RFB, del inglés *Replication Fork Block*) (Gillies et al., 2016; Huang and Moazed, 2003; Straight et al., 1999; Zaman et al., 2016) (Figuras I12; I15). La localización del complejo RENT en NTS1 depende de la proteína Fob1, que incluye entre sus funciones la de bloquear a la horquilla de replicación, previniendo colisiones entre la maquinaria de replicación y la de

transcripción (Brewer, 1988; Hwang and Madhani, 2009; Kobayashi, 2003; Mohanty and Bastia, 2004; Zaman et al., 2016). Este complejo también puede encontrarse alojado en la región NTS2, concretamente en la región del inicio de la transcripción (TIR, del inglés Transcription Initiation Region), debido a la unión de Cfi1/Net1 y Sir2 a Pol I (Gillies et al., 2016; Huang and Moazed, 2003) (Figura I12; I15).

Cfi1/Net1 estimula la síntesis del ARNr por interacción directa con Pol I (Shou et al., 2001) y, además, es necesaria para mantener la localización nucleolar de Cdc14, Sir2 y Nop1. Nop1, al ser una proteína que constituye el centro de las snoRNPs C/D, es esencial y muy abundante en el nucléolo (Shou et al., 2001; Tollervey et al., 1993), siendo uno de los componentes clave en la estructura y función de este orgánulo (Jansen et al., 1991; Shou et al., 2001). La delección de *CFI1/NET1* provoca que Nop1 se deslocalice y se acumule en el núcleo (Gillies et al., 2016; Shou et al., 2001; Straight et al., 1999), aunque se desconoce si este hecho se debe a una perturbación general de la estructura del nucléolo o si el complejo RENT controla la localización de Nop1 de forma específica (Shou et al., 2001; Tollervey et al., 1993). En cualquier caso, la deslocalización de Nop1 se asocia a la del ADNr (Jansen et al., 1991; Shou et al., 2001).

El locus del ADNr es una región que presenta una vigorosa tasa de transcripción y, debido a las repeticiones en tándem que alberga, en él se generan, frecuentemente, zonas de recombinación entre las cromátidas hermanas (también llamados puentes cromosómicos) (Sullivan et al., 2004). Para poder segregar el ADNr, la célula necesita eliminar estas zonas de recombinación, y lo hace en un proceso conocido como resolución cromosómica. El silenciamiento genético es fundamental en este proceso, pues convierte grandes regiones de ADN en zonas inaccesibles, resistentes a la transcripción, recombinación y replicación (Laurenson and Rine, 1992; Lustig, 1998). Tal silenciamiento se observa, además de en las repeticiones en tándem de los genes ADNr, en los loci sexuales y en las regiones teloméricas (Fritze et al., 1997; Gottschling et al., 1990; Rine and Herskowitz, 1987; Smith and Boeke, 1997; Straight et al., 1999). Mientras que en la mayoría de eucariotas esta inhibición de la transcripción tiene lugar en metafase, en *S. cerevisiae* ocurre durante anafase, jugando Sir2 un papel muy importante. De forma dependiente de NAD, Sir2 desacetila las histonas H3 y H4 alterando, como resultado, la estructura de la cromatina y haciéndola inaccesible a la maquinaria de recombinación (Kobayashi and Ganley, 2005; Smith et al., 1999; Zaman et al., 2016). Además, Sir2 silencia la transcripción mediada por la ARN Pol II (Gottschling, 2000; Guarente, 2000; Huang and Moazed, 2003; Nomura, 2001; Smith and Boeke, 1997; Zaman et al., 2016) y suprime la recombinación intracromosómica de

las repeticiones del ADNr debido, en parte, a la represión del promotor Epro, cuya transcripción facilita la recombinación (Kobayashi and Ganley, 2005; Zaman et al., 2016).

En anafase, el complejo RENT se desestabiliza, principalmente como consecuencia de la fosforilación de Cfi1/Net1 promovida por la ruta FEAR (Rock and Amon, 2009; Stegmeier and Amon, 2004; Stegmeier et al., 2002), liberándose así Cdc14 (Shou et al., 1999; Visintin et al., 1999) (y parte de Sir2 (Straight et al., 1999)). Esta cascada de señalización, como se ha indicado previamente, juega un papel fundamental en la estabilización del huso mitótico y la segregación de los telómeros y el ADNr (Pereira et al., 2002; Rock and Amon, 2009; Stegmeier and Amon, 2004; Stegmeier et al., 2002; Yellman and Roeder, 2015; Yoshida et al., 2002). El ADNr no es segregado hasta anafase tardía, justo antes de producirse la citocinesis (D'Amours et al., 2004), estando, de esta forma, la segregación nucleolar espacial y temporalmente separada y retrasada de la del resto del genoma (Torres-Rosell et al., 2004). En este proceso juega un papel clave la condensación cromosómica.

1.3. CONDENSACIÓN CROMOSÓMICA:

La condensación cromosómica es un proceso necesario para reducir la longitud de los brazos cromosómicos, proveer a los cromosomas de la rigidez estructural necesaria para que puedan ser trasladados a polos opuestos de la célula (St-Pierre et al., 2009), y también para eliminar las catenaciones de las cromátidas hermanas inducidas por la replicación del ADN (Cuylen and Haering, 2011; St-Pierre et al., 2009). Todas estas funciones son prerequisites independientes para una segregación cromosómica correcta durante mitosis (St-Pierre et al., 2009) y, por tanto, fundamentales para la transmisión precisa de la información genética durante la división celular (Lavoie et al., 2004). La condensación cromosómica es un proceso continuo y dinámico, que se inicia en G2 y persiste hasta anafase. Este proceso requiere la contribución de diferentes proteínas y complejos, incluyendo los complejos cohesina y condensina, la topoisomerasa tipo II (Topo II) y numerosas moléculas de señalización celular (Earnshaw et al., 1985; Lewis and Laemmli, 1982).

Las cohesinas y condensinas son complejos de proteínas esenciales que determinan la organización correcta de los cromosomas en las células (Hirano, 2005a). Estos complejos están muy conservados en la evolución desde procariotas a eucariotas

superiores, lo que demuestra la importancia de su función biológica (Tabla I1) (Hirano, 2005b).

Subunidades	<i>Homo sapiens</i>	<i>Xenopus</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Drosophila</i>	<i>C. merolae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>
SMC	hCAP-E	XCAP-E	AtCAP-E1/E2	DmSMC2	CMG189C	Cut14	Smc2
SMC	hCAP-C	XCAP-C	AtCAP-C	DmSMC4	CME029C	Cut3	Smc4
Específico I							
cabeza	hCAP-D2	XCAP-D2	CAB72176	CG1911	CMR484C	Cnd1	Ycs4
cabeza	hCAP-G	XCAP-G	BAB08309	CG17054	CMS422C	Cnd3	Ycs5/Ycg1
kleisina	hCAP-H	XCAP-H	AAC25941	Barren	CMF069C	Cnd2	Brn1
Específico II							
cabeza	hCAP-D3	XCAP-D3	At4g15890.1	CG31989	CM0236C	–	–
cabeza	hCAP-G2	XCAP-G2	At1g64960.1	–	CMA089C	–	–
kleisina	hCAP-H2	XCAP-H2	At3g16730.1	CG14685	CMI207C	–	–

Tabla I1. Subunidades condensinas en distintos organismos modelos. Las subunidades no-SMC de condensina I están conservadas desde levaduras hasta humanos, con algunas excepciones (nematodos). Las subunidades no-SMC de condensina II se encuentran en plantas y vertebrados, pero no así en levaduras. Modificado de (Hirano, 2005a).

Los complejos cohesinas y condensinas están formados por proteínas estructurales denominadas SMC (del inglés, *Structural Maintenance Chromosome*) y proteínas reguladoras no-SMC. El complejo cohesina está constituido por las proteínas Smc1, Smc3 (subunidades SMC), Scc1 y Scc3 (subunidades no-SMC) (Haering et al., 2002); mientras que el complejo condensina lo conforman las proteínas Smc2, Smc4 (subunidades SMC), Brn1, Ycs4 e Ycg1/Ycs5 (subunidades no-SMC) (Freeman et al., 2000; Lavoie et al., 2004) (Figura I16). La función del complejo cohesina es mantener unidas a las cromátidas hermanas hasta la transición metafase-anafase (Nitiss, 2009), mientras que el complejo condensina es fundamental para la compactación y segregación cromosómica, ya que sus subunidades pueden interaccionar con el ADN e inducir cambios conformacionales en esta molécula (Freeman et al., 2000).

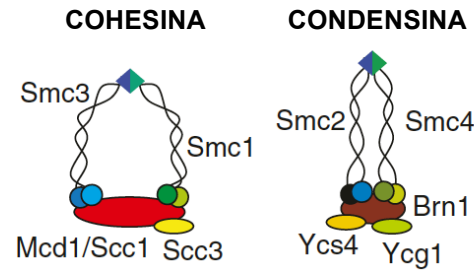


Figura I16: Complejos cohesinas y condensinas en *S. cerevisiae*. Dibujo esquemático de las subunidades que componen el complejo cohesina y condensina en *S. cerevisiae*. Adaptado de (Gartenberg and Merckenschlager, 2008).

En *S. cerevisiae*, la eliminación de cohesinas permite la separación de las cromátidas hermanas. Sin embargo, los telómeros y el ADN_r, posiblemente debido a la naturaleza repetitiva de estas regiones, necesitan mecanismos adicionales para su segregación (D'Amours et al., 2004) (Figura I17). En el caso del ADN_r, además, se precisa de la hiper-compactación del brazo largo del cromosoma XII, en el que se aloja el ADN_r, debido a la extensa longitud del mismo (Machin et al., 2005).

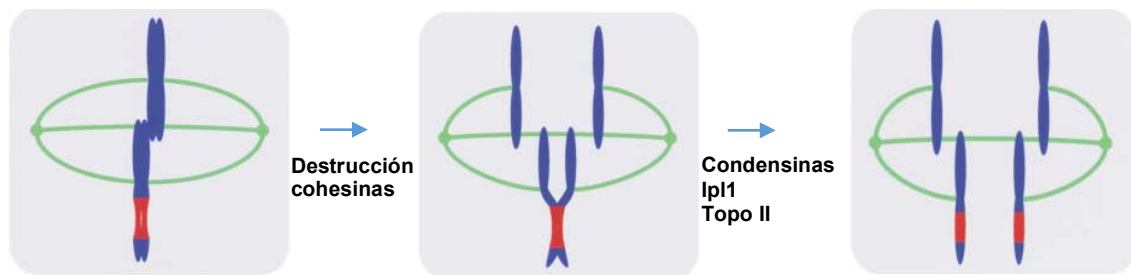


Figura I17: Modelo de segregación cromosómica. La destrucción de cohesinas permite la separación de la mayor parte del genoma (azul), pero no del ADN_r (rojo). Para la resolución del ADN_r se requiere la activación de Cdc14, lo cual contribuye a la activación de las condensinas, Topo II e Ipl1. Modificado de (Sullivan et al., 2004).

En *S. cerevisiae*, la condensación cromosómica, de este modo, está regulada en dos etapas diferentes. Durante la primera etapa, que abarca desde G2 hasta metafase, la condensación cromosómica se establece y se mantiene por una ruta dependiente de cohesinas; mientras que la segunda etapa transcurre en anafase, y durante la misma la condensación cromosómica se genera a través de una ruta independiente de cohesinas y dependiente de las proteínas Ipl1 y Topo II. La actividad de las proteínas Ipl1 y Topo II en la condensación en anafase está regulada por Cdc14, y determina, por un lado, el acortamiento longitudinal del brazo largo del cromosoma XII debido a la fosforilación de la histona H3 por Ipl1 (Lavoie et al., 2004) y, por otro lado, la resolución del ADN_r inducida por Topo II (Sullivan et al., 2004), pues esta enzima elimina completamente los entrecruzamientos que existen entre las cromátidas hermanas tras su replicación (uniones también conocidas como catenaciones), y antes de que se produzca su segregación. Ambas rutas que promueven la condensación son dependientes de condensinas (Lavoie et al., 2004) (Figura I17).

En *S. cerevisiae* las condensinas sufren modificaciones postraduccionales dependientes de ciclo, entre las que la fosforilación juega un papel predominante (Tsang et al., 2007), si bien no supone la única vía de regulación. Así, Smc4 es fosforilada por CDK (St-Pierre et al., 2009), y las tres subunidades reguladoras del complejo condensina (Ycs4, Ycg1 y Brn1) son fosforiladas directamente por Cdc5 e

indirectamente por Ipl1 (Bazile et al., 2010; Lavoie et al., 2004; St-Pierre et al., 2009). Por otro lado, la subunidad condensina Ycs4 es poli-sumoilada en anafase de forma dependiente de Cdc14 (D'Amours et al., 2004). Estas modificaciones que sufren las condensinas van aumentando hasta alcanzar niveles muy elevados al final de mitosis, provocando su hiper-activación, que se traduce en un superenrollamiento del ADN (St-Pierre et al., 2009). La localización de las condensinas también es dinámica a lo largo del ciclo, pues estas proteínas se encuentran uniformemente distribuidas en el núcleo desde G1 a metafase, mientras que, en anafase, se produce un enriquecimiento de estas moléculas tanto en el nucléolo como en los telómeros (Bhalla et al., 2002; Brito et al., 2010; D'Amours et al., 2004; Freeman et al., 2000; Gillies et al., 2016; Lavoie et al., 2004; Sullivan et al., 2004; Tsang et al., 2007; Wang et al., 2004). El enriquecimiento de las subunidades condensinas en el nucléolo se debe, en parte, a la acción de Cdc14. Esta fosfatasa inhibe la transcripción por la ARN Pol I, y permite la unión de condensinas en el locus *RDN* (Clemente-Blanco et al., 2009; D'Amours et al., 2004), tras lo cual este locus experimenta una transformación desde una estructura poco organizada hasta una estructura altamente ordenada (Hiraoka et al., 1989; Manders et al., 1999). El enriquecimiento de condensinas en el ADNr es necesario para que se produzca la compactación de este locus, y lo convierte en imprescindible para su segregación (Bhalla et al., 2002; Clemente-Blanco et al., 2009; D'Amours et al., 2004; Lavoie et al., 2004; Sullivan et al., 2004; Wang et al., 2004).

Las mutaciones en el complejo condensina, además de afectar a eventos relacionados con mitosis o meiosis, también influye en otros vinculados a la dinámica de la cromatina, la represión transcripcional o la recombinación (Tsang et al., 2007).

1.4. UN NUEVO FACTOR DE ENSAMBLAJE DE snoRNPs C/D : *HIT1*

Hit1 es una proteína de 164 aminoácidos caracterizada por presentar un dominio de dedos de zinc en su extremo N-terminal (Rothe et al., 2014). Originariamente, esta proteína se identificó en una búsqueda genética de mutantes sensibles a temperaturas elevadas, motivo por el cual adquirió su nombre, del inglés, *High Temperature growth* (Kawakami et al., 1992), aunque la función de Hit1 no se describió hasta años después, identificándose recientemente como un nuevo factor de ensamblaje de snoRNPs C/D (Rothe et al., 2014).

Específicamente, Hit1 contribuye, *in vivo*, a estabilizar las snoRNPs C/D, favoreciendo

la cinética de maduración del pre-ARNr. Se ha demostrado que Hit1 es necesaria para mantener niveles constantes de Rsa1, proteína a la que estabiliza formando un complejo con ella (Rothe et al., 2014). Esta actividad de Hit1 está conservada en eucariotas superiores, pues la proteína humana ZNHIT3 (también denominada TRIP3, del inglés *Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein3*), que presenta una secuencia homóloga con Hit1, regula a NUFIP1, el homólogo funcional de Rsa1 en *H. sapiens* (Bizarro et al., 2014; Rothe et al., 2014). De hecho, muchos factores importantes para el procesamiento del ARNr en *S. cerevisiae* están conservados en humanos. Así, las snoRNPs C/D humanas contienen, de forma similar a las de la levadura de gemación, un snoARN C/D y 4 proteínas centrales: 15.5K, Fibrilarina, Nop56 y Nop58, aunque para su ensamblaje se precisa, además, de un complejo chaperona, NUFIP, BCD1 y ZNHIT3 (Bizarro et al., 2014) (Tabla I2).

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>
Snu13	15.5K/NHPX
Nop56	NOP56
Nop58	NOP58
Nop1	Fibrilarina
Rsa1	NUFIP
Hit1	ZNHIT3/TRIP3
Prp31	PRP31

Tabla I2: Proteínas homólogas entre *S. cerevisiae* y humanos (Bizarro et al., 2015).

En humanos, ZNHIT3 controla el crecimiento, promueve la biogénesis de snoRNPs C/D y la síntesis de ribosomas, (Rothe et al., 2014), así como el procesamiento mediante “*splicing*” de los pre-ARNm (Hoskins and Moore, 2012; van der Feltz et al., 2012; Wahl et al., 2009). Por otro lado, ZNHIT3 es un co-activador de varios factores transcripcionales, y la desregulación de sus niveles celulares promueve la proliferación de células tumorales (Brito et al., 2008).

Defectos en ZNHIT3 también conducen a otro tipo de problemas que sugieren que, además de estabilizar a NUFIP, posee funciones adicionales (Bizarro et al., 2015; Rothe et al., 2014). Así, PRP31 es una proteína presente en las snRNPs U4 (un tipo de ARN nuclear) que interacciona con ZNHIT3, y se ha observado que la pérdida específica de esta interacción provoca retinitis pigmentosa (Deery et al., 2002; Huranova et al., 2009; Vithana et al., 2001). De forma interesante, en levaduras, también se ha verificado la interacción de Prp31 con algunos factores de ensamblaje de snoRNPs C/D, como Rsa1, Rvb1-2 (proteínas del complejo chaperona), Pih1 y Hit1 (Bizarro et al., 2015), lo que sugiere cierta conservación evolutiva de estos procesos entre distintas especies.

Recientemente, en *S. cerevisiae*, Hit1 se identificó en un *screening* general de mutantes sintéticos letales con la delección del gen *LTE1*, que, como se ha comentado codifica un activador de la ruta MEN (Ye et al., 2005). Este hecho sugiere que Hit1 podría desempeñar un papel en la regulación del ciclo celular, y más concretamente en el control de la ruta FEAR, pues dicha letalidad sintética es una característica común entre los mutantes deficientes en esta cascada de señalización (Stegmeier et al., 2002). Como se ha indicado anteriormente, la ruta FEAR promueve la liberación de Cdc14 desde el nucléolo hacia el núcleo durante las primeras etapas de anafase (Rock and Amon, 2009; Stegmeier and Amon, 2004; Stegmeier et al., 2002), lo cual es fundamental para la correcta coordinación espacio-temporal de eventos clave durante la transición metafase-anafase (Pereira et al., 2002; Rock and Amon, 2009; Stegmeier and Amon, 2004; Stegmeier et al., 2002; Yellman and Roeder, 2015; Yoshida et al., 2002).

2. OBJETIVOS:

Esta Tesis Doctoral tiene por objeto:

- 1.- Analizar el posible papel de Hit1 en la regulación de la actividad de Cdc14.
- 2.- Descifrar los mecanismos moleculares por los que un defecto en el factor de ensamblaje de snoRNPs C/D Hit1 puede afectar a la función de la fosfatasa Cdc14 durante las primeras etapas de la anafase.

3. RESULTADOS:

3.1. La ausencia simultánea de los genes *HIT1* y *LTE1* conduce a letalidad sintética, que es rescatada por la eliminación adicional de *BFA1*:

La ruta FEAR promueve una liberación de Cdc14 desde el nucléolo hacia el núcleo durante las primeras etapas de anafase en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Rock and Amon, 2009; Stegmeier and Amon, 2004; Stegmeier et al., 2002). Esta cascada de señalización, a diferencia de la ruta MEN (que promueve la liberación final de Cdc14 por toda la célula), no es esencial (Stegmeier and Amon, 2004). Sin embargo, la liberación inicial de Cdc14 mediada por la ruta FEAR es fundamental para la correcta coordinación espacio-temporal de eventos clave durante la transición metafase-anafase (Pereira et al., 2002; Rock and Amon, 2009; Stegmeier and Amon, 2004; Stegmeier et al., 2002; Yellman and Roeder, 2015; Yoshida et al., 2002). La importancia de FEAR en la regulación de la actividad de Cdc14 la demuestra el hecho de que esta cascada de señalización se hace indispensable para las células de *S. cerevisiae* en ausencia de *LTE1*, el activador de la ruta MEN (Stegmeier et al., 2002). Esta letalidad sintética, que puede ser rescatada mediante la inactivación adicional de *BFA1* (un inhibidor de MEN), ha sido, de hecho, ampliamente utilizada para identificar nuevos componentes de la ruta FEAR. Precisamente, en una búsqueda genética reciente de factores que podrían ser importantes para garantizar la liberación inicial de Cdc14 por la ruta FEAR se identificó a la proteína Hit1, un factor de ensamblaje de snoRNPs C/D, cuya ausencia es letal en células *lte1Δ* (Ye et al., 2005).

Para analizar un posible papel de Hit1 en la regulación de la actividad de Cdc14 decidimos, en primer lugar, verificar la letalidad sintética asociada a la deficiencia simultánea de *HIT1* y *LTE1*, así como comprobar adicionalmente si esta letalidad puede ser rescatada por la delección adicional de *BFA1*. Para ello, generamos células *hit1Δ lte1Δ* y *hit1Δ lte1Δ bfa1Δ* que portaban, adicionalmente, el plásmido centromérico Ycp50-*LTE1::URA3*. Este plásmido contiene tanto una copia silvestre del gen *LTE1* bajo el control de su propio promotor como otra del gen *URA3*, que confiere prototrofia para el uracilo a las células del fondo genético W303 (todas las estirpes utilizadas en nuestros ensayos son derivadas de este fondo genético y, por tanto, muestran auxotrofia para el uracilo). Usando las estirpes anteriores, y en una primera aproximación, estudiamos la viabilidad de esporas generadas a partir de distintos cruces genéticos en función del genotipo de las mismas (Figura R1 A). Así, y mientras que las esporas *hit1Δ lte1Δ*

Ycp50-*LTE1*::*URA3* resultaban ser viables, las esporas *hit1Δ lte1Δ* que perdían el plásmido (y, por tanto, la copia silvestre de *LTE1*) no daban lugar a colonias, indicando que, de acuerdo con lo descrito anteriormente (Ye et al., 2005), la ausencia simultánea de los genes *HIT1* y *LTE1* determina letalidad sintética. Por otro lado, y de forma importante, las esporas *hit1Δ lte1Δ bfa1Δ* eran perfectamente viables (Figura R1 A), lo que demuestra que la letalidad sintética de las células *hit1Δ lte1Δ* es recuperable por la ausencia adicional de *BFA1*.

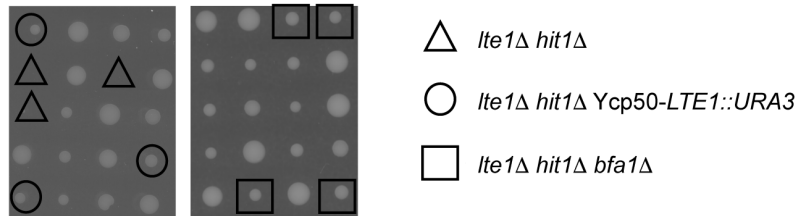
Si bien los resultados previos están de acuerdo con la posibilidad de que la deficiencia de Hit1 afecte la liberación inicial de Cdc14, y con el fin de reforzar esta idea, llevamos a cabo adicionalmente un análisis de la capacidad de las células *hit1Δ lte1Δ* Ycp50-*LTE1*::*URA3* de crecer en presencia de ácido 5-fluoroorótico (FOA), un compuesto que resulta tóxico para aquellas células capaces de realizar la ruta completa de biosíntesis del uracilo (Yano et al., 2005) (Figura R1 B). Para poder crecer en presencia de este compuesto, las células *hit1Δ lte1Δ* Ycp50-*LTE1*::*URA3* deben perder el plásmido que portan, ya que les confiere prototrofia para el uracilo. Sin embargo, si la falta simultánea de Hit1 y Lte1 conduce a letalidad sintética, estas células no deberían ser capaces de crecer en presencia de FOA en ningún caso, puesto que la pérdida del plásmido, a pesar de devolverles la auxotrofia para el uracilo, supondría también perder la única copia funcional de *LTE1* que portan las células. Nuestro análisis, de acuerdo a los resultados previos, demostraba que, en efecto, y al contrario de lo que ocurre para las células del tipo silvestre o para los mutantes simples *hit1Δ* o *lte1Δ*, las células *hit1Δ lte1Δ* Ycp50-*LTE1*::*URA3* eran incapaces de crecer en presencia de FOA (Figura R1 B), si bien la capacidad de crecer en presencia de FOA podía restaurarse cuando las células portaban adicionalmente una delección del gen *BFA1* (Figura R1 B).

Finalmente, y de forma paralela a los ensayos anteriores, verificamos también la capacidad de una estirpe *hit1Δ* en la que el gen *LTE1* endógeno se encontraba bajo el control del promotor de los genes *GAL1-10*, cuya expresión es reprimible por glucosa, de crecer usando este azúcar como fuente de carbono. De acuerdo con las observaciones previas, las células de dicha estirpe eran incapaces de crecer cuando la expresión de *LTE1* era inhibida, a menos que el gen *BFA1* fuera eliminado adicionalmente en dicho fondo genético (Figura R1 C).

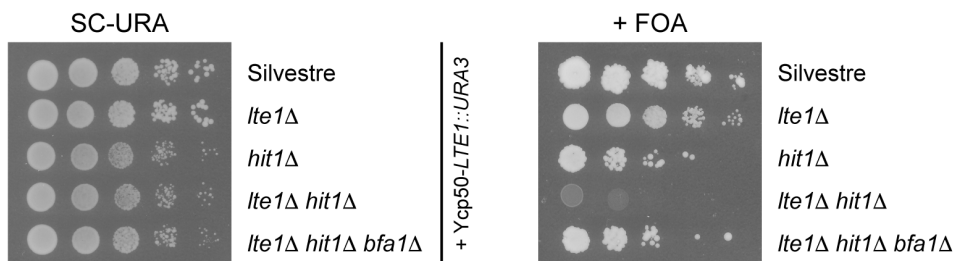
En conjunto, los resultados previos verifican, usando hasta tres estrategias diferentes, que la ausencia combinada de los genes *HIT1* y *LTE1* determina letalidad sintética. Además, en base a que dicha letalidad sea recuperable por la ausencia adicional de *BFA1*, una característica que, como se ha indicado previamente, es compartida por los

mutantes de componentes de la ruta FEAR que promueven la actividad de esta cascada de señalización, nuestros resultados también sugieren un posible papel de la proteína Hit1 en el control de la liberación temprana de la fosfatasa Cdc14.

A



B



C

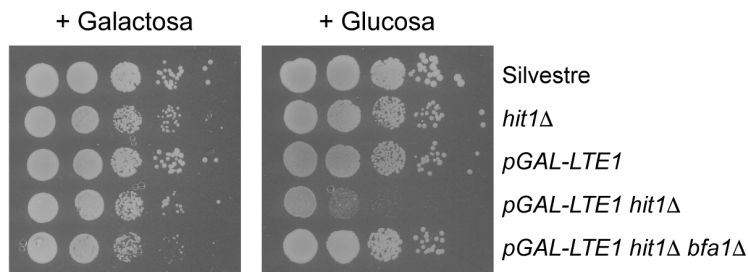


Figura R1: La delección simultánea de *HIT1* y *LTE1* determina letalidad sintética, la cual puede ser rescatada por la inactivación de *BFA1*. (A) Esporas generadas mediante cruces entre células *hit1Δ* (F1288) y *lte1Δ Ycp50-LTE1::URA3* (F528), y entre células *hit1Δ bfa1Δ* (F1289) y *lte1Δ Ycp50-LTE1::URA3* (F528). Se señalan con un triángulo las esporas con genotipo *lte1Δ hit1Δ*; un círculo, las esporas con genotipo *lte1Δ hit1Δ Ycp50-LTE1::URA3*; y un cuadrado, las esporas con genotipo *lte1Δ hit1Δ bfa1Δ*. (B) Células del tipo silvestre (F1312) y de los mutantes *lte1Δ* (F527), *hit1Δ* (F2065), *lte1Δ hit1Δ* (F2061) y *lte1Δ hit1Δ bfa1Δ* (F2130), todas ellas portando inicialmente el plásmido centromérico Ycp50-LTE1::URA3, se cultivaron en placas de medio mínimo sin uracilo (SC-URA) o medio mínimo con FOA (0,3 mg/ml) (+FOA) a 23°C, partiendo de diluciones seriadas 1/10 en medio líquido (DO₆₀₀= 0,5). (C) Células del tipo silvestre (F496), y de los mutantes *hit1Δ* (F2000), *pGAL-LTE1* (F1468), *pGAL-LTE1 hit1Δ* (F2297) y *pGAL-LTE1 hit1Δ bfa1Δ* (F2126) se cultivaron en placas de medio rico (YP) con 2% galactosa 2% rafinosa (+Galactosa) o 4% glucosa (+Glucosa) a 23°C, partiendo de diluciones seriadas 1/10 (DO₆₀₀= 0,3).

3.2. La expresión y localización de *HIT1* se mantiene constante a lo largo del ciclo celular:

Para evaluar un posible papel de Hit1 en el control de la liberación de Cdc14 durante anafase temprana analizamos, en primer lugar, la expresión y localización de Hit1 durante el ciclo celular.

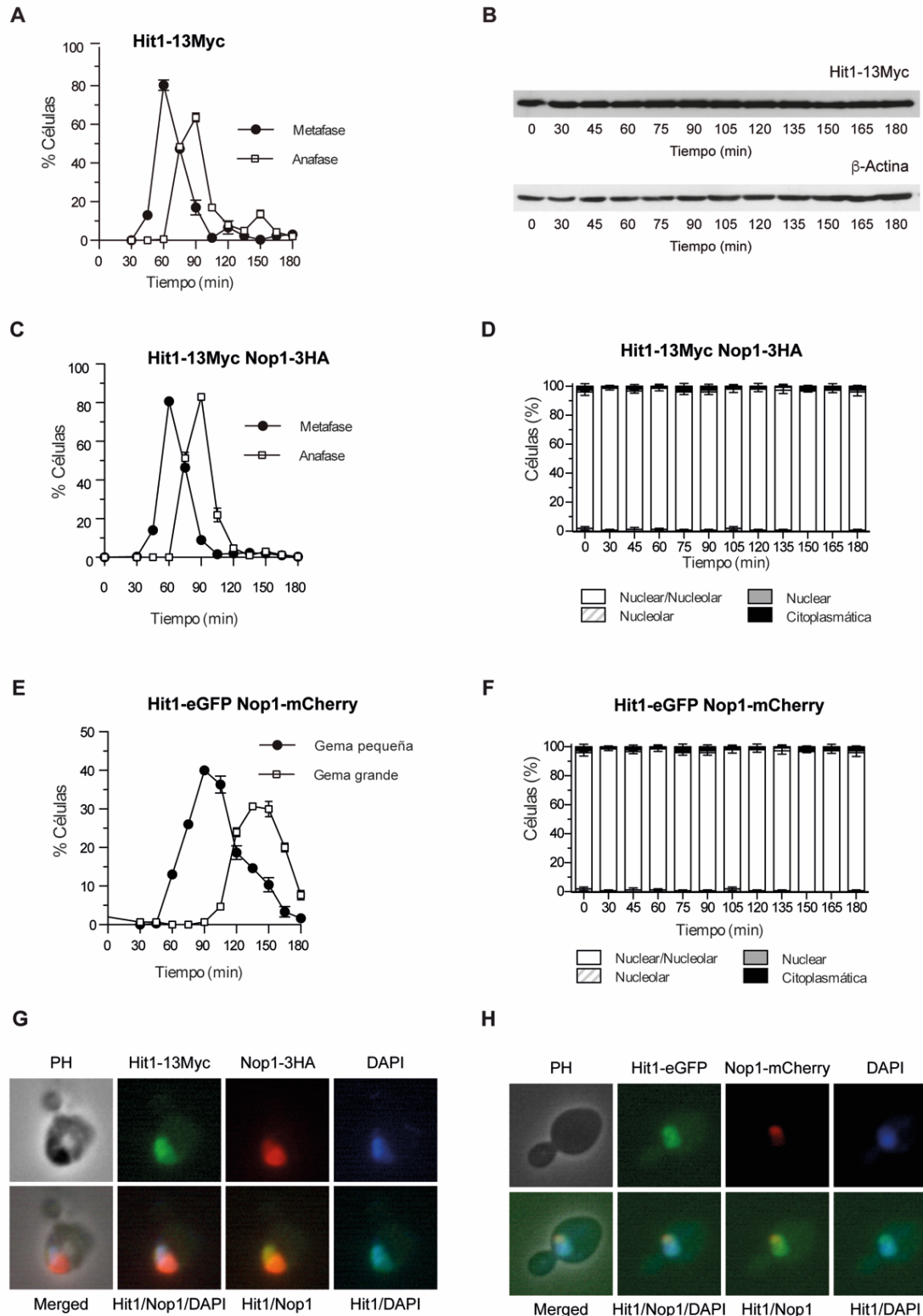


Figura R2: La expresión y localización de Hit1 se mantiene constante a lo largo del ciclo celular.

(A, B) Células que expresaban una versión marcada de Hit1 con 13 copias del epítipo Myc (Hit1-13Myc, F1389) se cultivaron a 26°C en YPD y fueron bloqueadas en G1 con factor- α (5 μ g/ml). Cuando el bloqueo se completó, las células se liberaron en medio YPD sin feromona a 26°C (t=0). (A, C) Porcentaje de células en metafase y anafase en función del tiempo según el análisis de la morfología nuclear y del huso mitótico, determinados indirectamente mediante inmunofluorescencia. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) (n=3). (B) La expresión de Hit1-13Myc a lo largo del ciclo fue analizada mediante Western. Los niveles de proteína β -actina fueron usados como control de carga. (C, D) Células con versiones de Hit1 y Nop1 marcadas, respectivamente, con 13Myc y 3HA (F1921), se cultivaron a 26°C en YPD y se sincronizaron en G1 con factor- α (5 μ g/ml). Cuando el bloqueo se completó, las células se liberaron en medio YPD sin feromona a 26°C (t=0). (E, F) Células expresando una versión de Hit1 marcada con eGFP y de Nop1 marcada con mCherry (F1744) se cultivaron como en el caso anterior, pero a 30°C y en medio YPD que contenía, además, 300 μ g/ml de adenina. (E) Porcentaje de células con gemas pequeñas y grandes a lo largo del ciclo. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) (n=3). (D,F) Porcentaje de células con una localización de Hit1 tanto nuclear como nucleolar (barras blancas), exclusivamente nucleolar (barras rayadas), exclusivamente nuclear (barras grises) o con localización citoplasmática (barras negras). (G) Imagen representativa de una célula silvestre que expresa Hit1-13Myc (en verde) y Nop1-3HA (en rojo) (F1921). Adicionalmente, se muestra la morfología del núcleo (DAPI, en azul) y la morfología celular (contraste de fases, PH), así como una imagen de todas las imágenes superpuestas (Merged). (H) Imagen representativa de una célula silvestre que expresa Hit1-eGFP (en verde), Nop1-mCherry (en rojo) (F1744). Adicionalmente, se muestra la morfología del núcleo (DAPI, en azul) y la morfología celular (PH), junto a las imágenes superpuestas (merged).

El análisis mediante la técnica de Western de la expresión de Hit1 demostró que los niveles de esta proteína se mantienen constantes a lo largo de todo el ciclo celular. Este análisis, además, no parece sugerir que Hit1 sufra cambios postraduccionales (Figuras R2 A y B). De igual modo, la localización de Hit1 tampoco sufría cambios dependientes de ciclo (Figuras R2 C, D, E y F). Sin embargo, de forma interesante, este estudio demostró que dicha proteína se localiza tanto en el núcleo como en el nucléolo de la célula durante todo el ciclo celular, independientemente de la técnica de microscopía utilizada (Figuras R2 G y H). Hit1, por tanto, presenta una localización subcelular óptima para ser un factor que podría influir en la liberación temprana de Cdc14.

3.3. La sobreexpresión de *HIT1* determina problemas de viabilidad celular:

La sobreexpresión de componentes FEAR puede inducir una liberación prolongada de Cdc14 desde el nucléolo que determina una salida prematura de mitosis. De este modo,

niveles elevados de *SPO12*, por ejemplo, pueden suprimir la letalidad de mutantes termosensibles de la ruta MEN, tales como *cdc5-1*, *dbf2-2* o *tem1-3* (Jaspersen et al., 1998; Stegmeier et al., 2002; Visintin et al., 2003). Con el objetivo de profundizar en el análisis de un posible papel de *HIT1* en la regulación de la ruta FEAR, nos propusimos estudiar los efectos de su sobreexpresión. Con este fin, utilizamos células en las que el gen *HIT1* se encontraba regulado bajo el control del promotor de los genes *GAL1-10*.

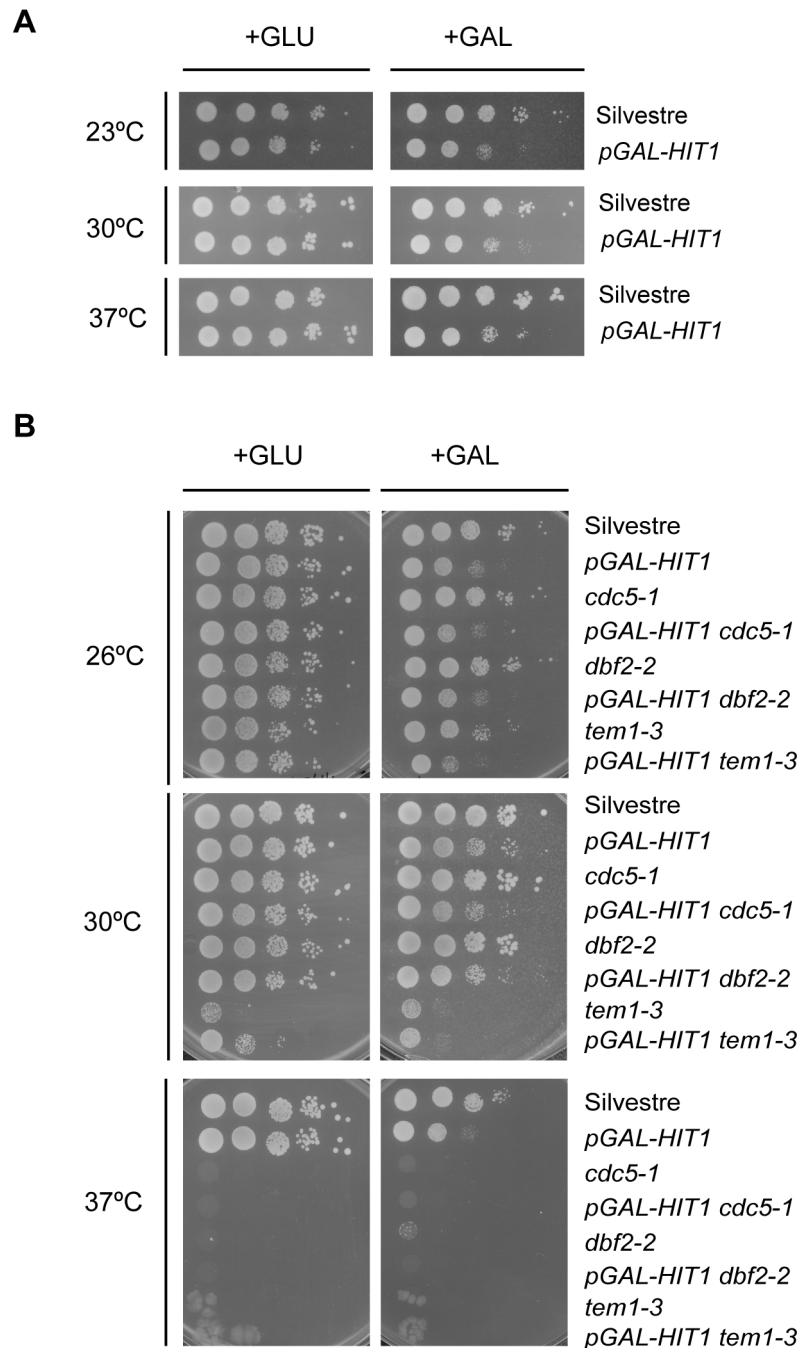


Figura R3: La sobreexpresión de *HIT1* determina problemas de viabilidad celular. (A) Células del tipo silvestre transformadas con el plásmido pRS316 (F651), así como células transformadas con el mismo plásmido, pero en el que se había integrado una copia del gen *HIT1* bajo el control del

promotor de la galactosa *GAL1-10* (*pGAL-HIT1*, F1609), se cultivaron en placas de medio mínimo sin uracilo con 2% glucosa (+GLU) o con 2% de galactosa (+GAL), partiendo de diluciones seriadas 1/10 en medio líquido ($DO_{600}=0,3$). Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas en cada caso. (B) Células del tipo silvestre (F651), y de los mutantes *pGAL-HIT1* (F1609), *cdc5-1* (F2186), *pGAL-HIT1 cdc5-1* (F2187), *dbf2-2* (F2188), *pGAL-HIT1 dbf2-2* (F2189), *tem1-3* (F2190) y *pGAL-HIT1 tem1-3* (F2191) se cultivaron en placas de medio mínimo sin uracilo y con 2% glucosa (+GLU) o con 4% de galactosa (+GAL) a las temperaturas indicadas en cada caso, partiendo de diluciones seriadas 1/10 en medio líquido ($DO_{600}=0,3$).

A diferencia de la sobreexpresión de Spo12, niveles incrementados de Hit1 no recuperaban la viabilidad de los mutantes *cdc5-1*, *dbf2-2* o *tem1-3* (Figura R3 B). No obstante, es importante señalar que la sobreexpresión de Hit1 determinaba problemas de viabilidad celular, independientemente de la temperatura a la que las células eran cultivadas (Figura R3 A). Por tanto, la incapacidad de recuperar la viabilidad de los mutantes en la ruta MEN podría deberse a que los niveles incrementados de Hit1 determinan problemas adicionales no relacionados con su posible papel en la regulación de la localización de Cdc14.

3.4. La ausencia de *HIT1* retrasa la salida de mitosis:

Para analizar en mayor detalle un posible papel de Hit1 en el control de la salida de mitosis, estudiamos la progresión del ciclo celular en un mutante *hit1Δ*. Con este fin, las células de dicho mutante se bloquearon primero en G1, y se liberaron posteriormente con el fin de que entraran en el ciclo de forma sincrónica. La progresión a lo largo del ciclo se determinó mediante el análisis de la morfología del huso mitótico y del núcleo, así como a través de la cuantificación de los niveles de expresión de Pds1 (securina, que es degradada en la transición metafase-anafase (Cohen-Fix et al., 1996)) y Clb2 (cyclina mitótica que se degrada durante la salida de mitosis (Wasch and Cross, 2002)) (Figuras R4 A-D). La delección de *HIT1* causaba un retraso general en la progresión a través de las distintas etapas del ciclo. Sin embargo, y a pesar de este retraso general, mientras que las células *hit1Δ* se acumulaban en metafase aproximadamente sólo 15 minutos después de que lo hicieran las células del tipo silvestre, el mutante *hit1Δ* completaba la salida de mitosis con 75 minutos de retraso respecto al silvestre (Figuras R4 C y D). Esta observación está de acuerdo con que las células *hit1Δ*, a pesar de sufrir un retraso general en la progresión del ciclo, muestren, de forma particular, un problema en el proceso de salida de mitosis.

Como se ha comentado, *HIT1* fue originariamente descrito como un gen esencial para el crecimiento a temperaturas elevadas (Reijo et al., 1993), fenotipo que contrasta con el de las células *lte1Δ*, que son criosensibles (Wickner et al., 1987) (Figura R4 E). De hecho, el propio nombre de ambos genes hace referencia a sus fenotipos (*HIT1*, del inglés, *H*igh *T*emperature growth; y *LTE1*, de *L*ow *T*emperature *E*ssential 1). Con el fin de analizar si el retraso en el ciclo celular observado para los mutantes *hit1Δ* era mayor a temperaturas elevadas, se analizó la progresión del ciclo en estos mutantes también a 37°C (Figuras R4 F y G). Este análisis indicaba que el impacto sobre la progresión del ciclo celular a esta temperatura era muy similar al encontrado a 26°C, lo cual sugiere que la termosensibilidad de las células *hit1Δ* no está específicamente ligada a la posible función de Hit1 en la regulación de la progresión del ciclo celular, sino a problemas adicionales que estas células muestran a temperaturas elevadas.

El retraso en la degradación de Pds1 y Clb2 al final de mitosis en células *hit1Δ* podría sugerir una posible activación del punto de control de ensamblaje del huso mitótico (SAC), que detiene las células en metafase (Lew and Burke, 2003; Musacchio and Salmon, 2007). De este modo, decidimos evaluar la posibilidad de que las células *hit1Δ* presentaran un defecto en la estabilidad genómica que las hiciera más dependiente de este *checkpoint*. La activación del SAC puede inducirse en las células mediante la adición de drogas despolimerizadoras de microtúbulos al medio de cultivo, como el benomilo, que impiden la formación del huso mitótico. En presencia de benomilo, las células que no poseen un SAC funcional salen inapropiadamente del ciclo celular, lo cual determina una pérdida de viabilidad. Así, las células *mad1Δ* son incapaces de crecer en presencia de esta droga. Sin embargo, y sorprendentemente, las células *hit1Δ* eran capaces de crecer en presencia de benomilo incluso mejor que la estirpe silvestre (Figura R5 A). Si bien desconocemos la causa de la hiper-resistencia del mutante *hit1Δ* al tratamiento con benomilo, este resultado sugiere que la falta de expresión de Hit1 no conduce a una activación del SAC.

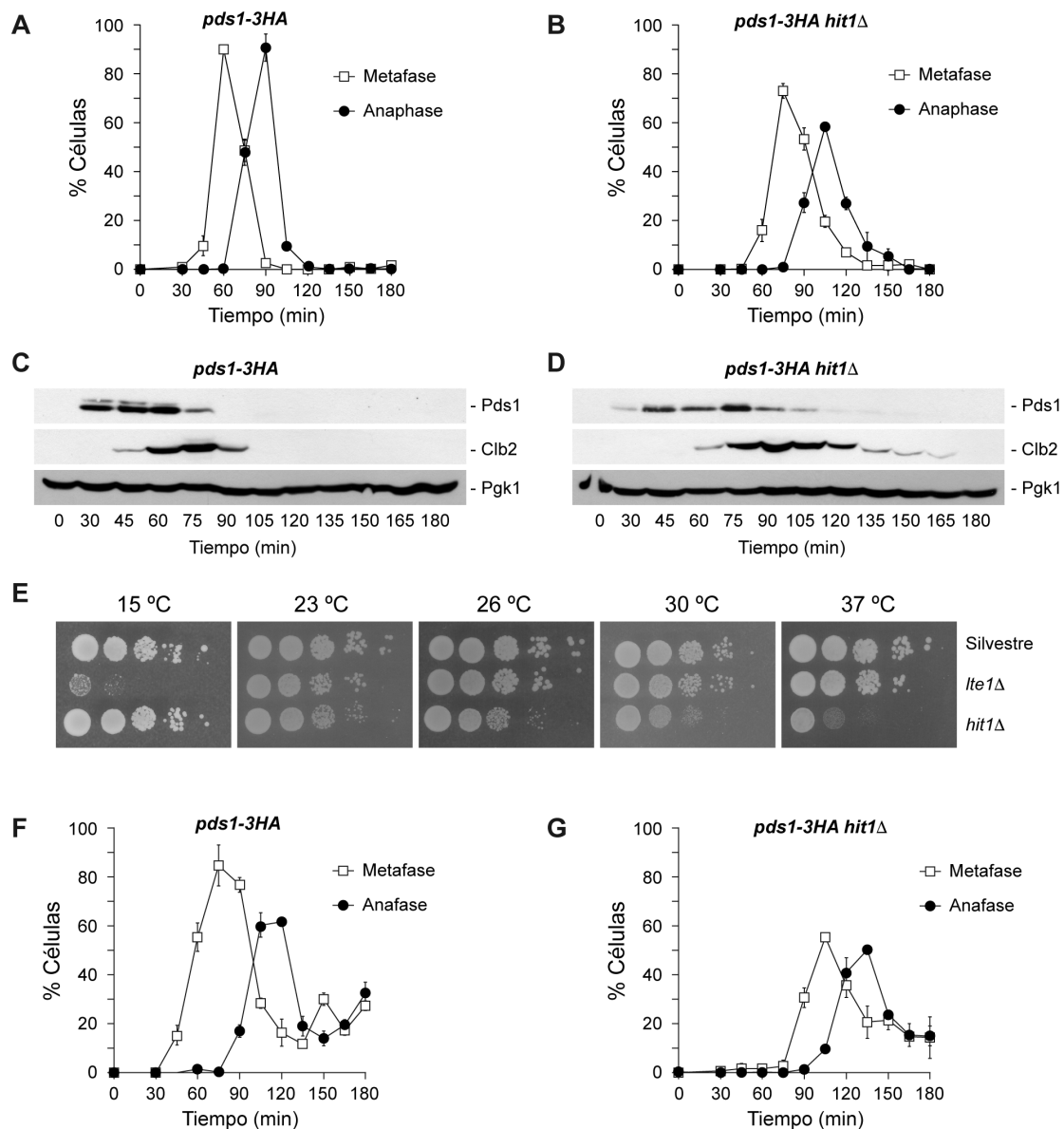


Figura R4: La delección de *HIT1* retrasa la salida de mitosis. (A, B, C y D) Células del tipo silvestre (F1586) y del mutante *hit1Δ* (F1423) expresando ambas una versión de Pds1 marcada con 3HA, se crecieron en YPD a 23°C, se bloquearon en G1 con factor- α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio YPD sin feromona a 26°C. (A y B) La progresión del ciclo celular se determinó mediante el análisis de la morfología nuclear y del huso mitótico por inmunofluorescencia. En cada punto, se muestran los porcentajes de células en metafase y anafase. Las barras de error representan la SD (n=3). (C y D) La expresión de Pds1-3HA y Clb2 se analizó por Western. Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga. (E) Células del tipo silvestre (F496), y de los mutantes *lte1Δ* (F549) y *hit1Δ* (F2000) se crecieron en placas de YPD a partir de diluciones seriadas 1/10 a partir de un cultivo líquido (DO₆₀₀= 0,3). En cada caso, las placas se incubaron a la temperatura indicada. (F, G) Células del tipo silvestre (F1586) y *hit1Δ* (F1423), expresando ambas una versión marcada de Pds1 con 3HA, se crecieron en YPD a 23°C, se bloquearon en G1 con factor- α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio YPD libre de feromona a 37°C. La progresión del ciclo celular fue determinada mediante el análisis de la morfología del núcleo y del huso mitótico por inmunofluorescencia. Tras la liberación, se representa para cada

punto los porcentajes de células en metafase y anafase. Las barras de error se corresponden con la SD (n=3).

En paralelo al análisis anterior, decidimos estudiar el efecto de suprimir componentes esenciales del SAC (como los codificados por los genes *MAD1* y *MAD2*) en células que carecen de *HIT1*, con el fin de evidenciar un posible problema en la unión de los cromosomas al huso mitótico en el mutante *hit1Δ*. De acuerdo con lo observado anteriormente, nuestros resultados indican que las células *hit1Δ mad1Δ* o *hit1Δ mad2Δ* no mostraban problemas adicionales de viabilidad en comparación con el mutante simple *hit1Δ* (Figura R5 B). En células que carecen de *HIT1*, por tanto, la ausencia de un SAC funcional no determina defectos sinérgicos de crecimiento.

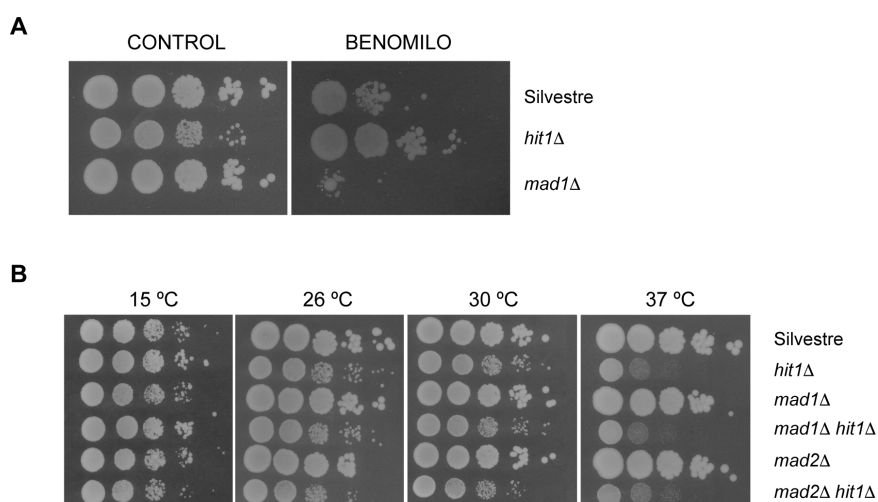


Figura R5: La falta de *HIT1* no hace a las células más dependientes del SAC. (A) Células del tipo silvestre (F496), y las mutantes *hit1Δ* (F2000) y *mad1Δ* (F350) se crecieron en placas control (DMSO) o con benomilo (20 μg/ml) a 23°C, a partir de diluciones seriadas 1/10 en cultivo líquido YPD (DO₆₀₀= 0,3). (B) Células del tipo silvestre (F496), y los mutantes *hit1Δ* (F2000), *mad1Δ* (F350) *hit1Δ mad1Δ* (F2253) *mad2Δ* (F2349) y *hit1Δ mad2Δ* (F2652) se crecieron en placas de YPD a la temperatura indicada en cada caso a partir de diluciones seriadas 1/10 en cultivo líquido (DO₆₀₀= 0,3).

En resumen, nuestros resultados sugieren que las células *hit1Δ* no presentan defectos en el proceso de captura de los cinetocoros por el huso mitótico, y descartan una posible activación del SAC como consecuencia de la falta de Hit1.

3.4.1. La ausencia de *HIT1* provoca un retraso en la liberación de Cdc14:

Nuestros resultados previos sugieren que Hit1 podría ser un factor importante en la liberación de Cdc14 promovida por la ruta FEAR durante anafase temprana. Para verificarlo, analizamos la dinámica de liberación de Cdc14 durante la progresión del ciclo celular en células *hit1Δ*. Para eliminar de este análisis el efecto del retraso en la progresión del ciclo celular observado en ausencia de *HIT1* en etapas previas a la transición metafase-anafase, bloqueamos las células en metafase condicionalmente mediante la inactivación de Cdc20, evaluando la localización de Cdc14 en las células una vez que este cofactor del APC/C era reactivado. En concreto, construimos células *hit1Δ* en las que el gen *CDC20* endógeno está bajo el control del promotor del gen *MET3* (*pMET3-CDC20*), que puede ser inhibido mediante la adición de metionina al medio. En células *pMET3-CDC20 hit1Δ* se observaba que, tras la reactivación de Cdc20 después de un bloqueo inicial en metafase, se producía un retraso en la liberación de la fosfatasa Cdc14, en comparación con las células del tipo silvestre (Figuras R6 A-D).

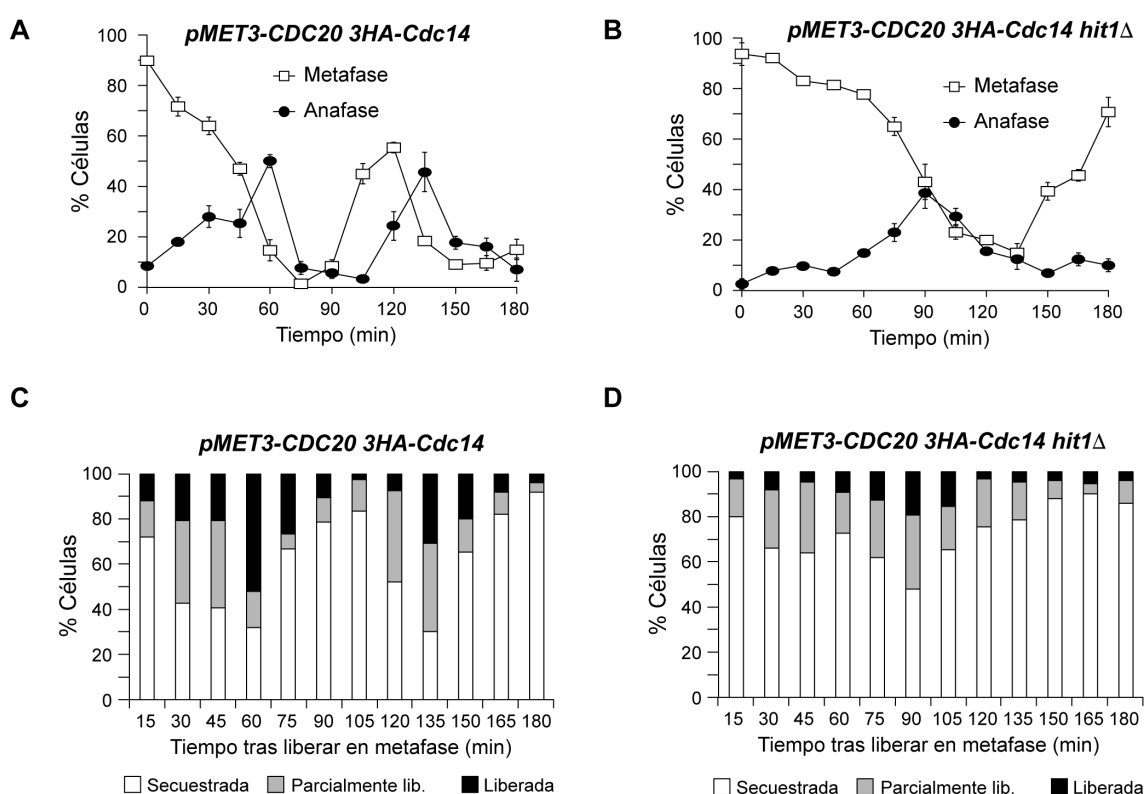


Figura R6: Retraso en la liberación de Cdc14 en células *hit1Δ*. (A, B, C, D) Células del tipo silvestre (F1633) y del mutante *hit1Δ* (F1634), expresando el gen *CDC20* endógeno bajo el control del promotor del gen *MET3* (*pMET3-CDC20*), y el alelo *CDC14* marcado con 3HA, se crecieron en medio mínimo sin metionina a 26°C, se bloquearon en G1 con factor- α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio mínimo sin

feromona y con 8 mM metionina, para impedir la expresión de *CDC20*, a 26°C. Una vez que las células se bloquearon en metafase (t=0 minutos), se volvieron a liberar en medio mínimo sin metionina, permitiéndoles progresar por el ciclo celular. (A, B) La progresión del ciclo celular se determinó mediante el análisis de la morfología del núcleo y del huso mitótico por inmunofluorescencia. Tras la liberación, se representa para cada punto los porcentajes de células en metafase y anafase. Las barras de error se corresponden con la SD (n=3). (C, D) Porcentaje de células que presentan 3HA-Cdc14 secuestrada en el nucléolo (barras blancas), parcialmente liberada al nucleoplasma (barras grises) o totalmente liberada en el citoplasma (barras negras) en cada punto, determinado indirectamente mediante inmunofluorescencia. Las barras de error representan la SD (n=3).

El retraso en salida de mitosis de las células *hit1Δ*, por otro lado, se asociaba a un retraso en liberación de Cdc14. Debido a que este ensayo no nos permite diferenciar entre la liberación temprana (dependiente de FEAR) y la liberación tardía (dependiente de MEN) de Cdc14, decidimos repetir el experimento utilizando células que portaban, adicionalmente, el alelo *cdc15-as1*, el cual expresa una versión de la quinasa Cdc15 que puede ser inhibida condicionalmente usando 1-NA-PP1, un análogo del ATP (Bishop et al., 2000). La inactivación de Cdc15-as1 previene la liberación de Cdc14 dependiente de MEN (Stegmeier et al., 2002), facilitando de este modo la evaluación del impacto específico de la pérdida de Hit1 sobre la liberación parcial y transitoria de la fosfatasa inducida por la ruta FEAR.

El análisis de la localización de Cdc14 indicaba que las células *pMET3-CDC20 cdc15-as1*, tras el bloqueo de metafase, liberaban transitoriamente Cdc14 desde el nucléolo hasta el núcleo, aunque rápidamente la fosfatasa volvía a re-secuestrarse en el nucléolo como resultado de la inhibición de MEN (Figuras R7 A y B). Esta liberación transitoria de Cdc14 no se observó, sin embargo, en células *pMET3-CDC20 cdc15-as1 spo12Δ bns1Δ*, las cuales tienen inactivada la ruta FEAR por la deficiencia simultánea de los genes *SPO12* (componente de FEAR) y *BNS1* (Stegmeier et al., 2002) (gen parálogo de *SPO12* cuya sobreexpresión recupera los efectos provocados por la ausencia de *SPO12*) (Byrne and Wolfe, 2005; Grether and Herskowitz, 1999) (Figuras R7 C y D). De forma similar, la liberación de Cdc14 tampoco se observaba en células *pMET3-CDC20 cdc15-as1 hit1Δ* (Figuras R7 E y F). Estos resultados demuestran, de acuerdo con nuestra hipótesis inicial, que la eliminación de *HIT1* provoca un retraso en la liberación de Cdc14 desde el nucléolo promovida por la ruta FEAR en las etapas iniciales de anafase.

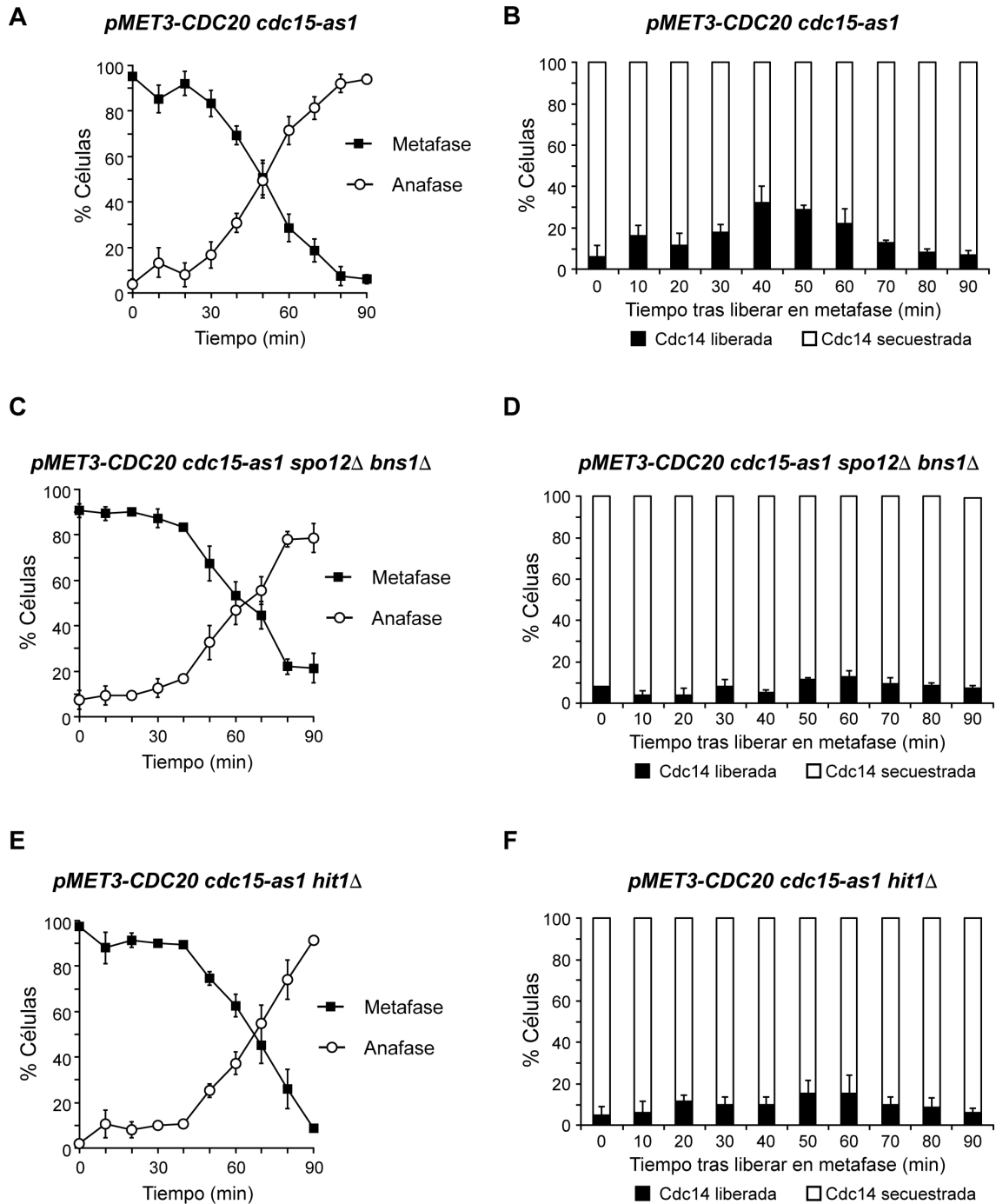


Figura R7. Liberación de Cdc14 dependiente de FEAR en células *hit1Δ*. (A-F) Células del tipo silvestre (F2073) y de los mutantes *spo12Δ bns1Δ* (F2508) y *hit1Δ* (F2205), todas ellas portando el alelo *cdc15-as1*, el gen *CDC20* endógeno bajo el control del promotor *MET3* (*pMET3-CDC20*) y el alelo *CDC14* marcado con 3HA, se crecieron a 26°C en medio mínimo sin metionina, se bloquearon en G1 con factor- α (7,5 μ g/ml) y se liberaron a 26°C en medio mínimo sin feromona y con metionina 8 mM, para impedir la expresión de *CDC20*. Una vez que las células se bloquearon en metafase (t=0 minutos), se volvieron a liberar en medio mínimo sin metionina y con 1-NA-PP1 10 μ M, para volver a bloquearlas, esta vez, en anafase. (A, C, E) La progresión del ciclo celular se determinó mediante el análisis de la morfología del huso mitótico y del núcleo. En cada punto, se representan los porcentajes de células en metafase y anafase. Las barras de error representan la SD (n=3). (B, D, F) Porcentaje

de células que presentan 3HA-Cdc14 secuestrada en el nucléolo (barras blancas) o liberada del mismo (barras negras) en cada punto, determinado indirectamente mediante inmunofluorescencia. Las barras de error representan la SD (n=3).

Para confirmar, utilizando otra estrategia distinta, que la pérdida de Hit1 afecta a la liberación temprana de Cdc14, analizamos si la liberación forzosa de Cdc14 desde el nucléolo como consecuencia de la sobreexpresión de *CDC14* era capaz de mitigar los fenotipos observados en las células deficientes en *HIT1*. Para ello, usamos células en las que el gen *CDC14* se encontraba bajo el control del promotor de los genes *GAL1-10*, o de una versión atenuada del mismo (*pGALL*), ambos inducibles por galactosa. Niveles elevados de expresión de *CDC14*, no obstante, resultaron ser letales para las células incluso utilizando el promotor atenuado *pGALL*, lo que impedía estudiar el efecto de la sobreexpresión de la fosfatasa en células que no expresan *HIT1* (Figura R8).

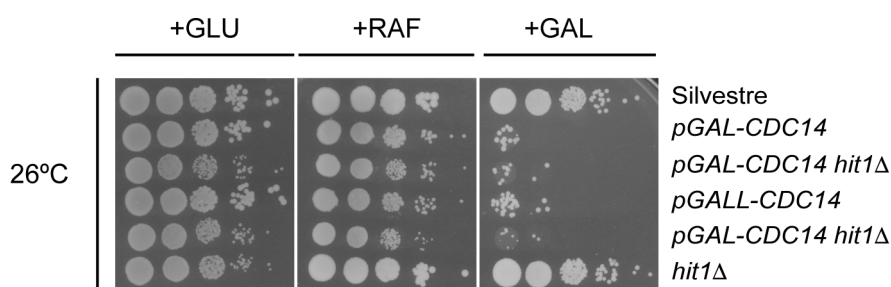
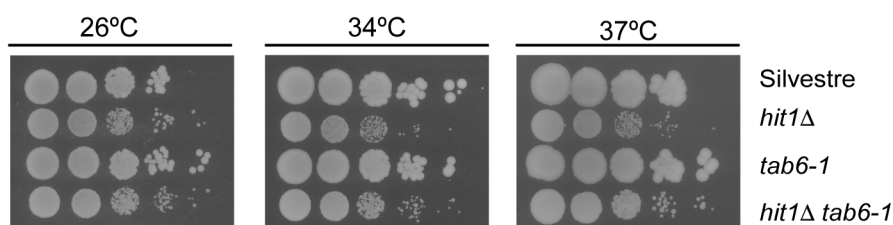


Figura R8: La sobreexpresión de *CDC14* es letal. Células del tipo silvestre (F496), y de los mutantes (*pGAL-CDC14*, F2618), *pGAL-CDC14 hit1Δ* (F2619), (*pGALL-CDC14*, F2615), *pGALL-CDC14 hit1Δ* (F2616) y *hit1Δ* (F2000), las cuales contenían en el locus *URA3* una copia adicional de *CDC14* bajo el control del promotor de la galactosa *GAL1-10* (*pGAL-CDC14*) o bajo el control de la versión atenuada de este promotor (*pGALL-CDC14*) se cultivaron en placas de YP con 2% glucosa (+GLU), con 2% rafinosa y 0,5% galactosa (+RAF) o con 2% de galactosa (+GAL), a partir de diluciones seriadas 1/10 en medio líquido ($DO_{600}=0,3$), e incubadas a 26°C.

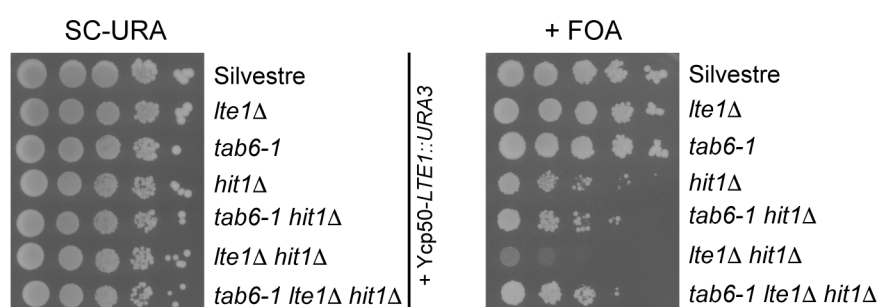
Debido a la letalidad celular asociada a la sobreexpresión de *CDC14*, decidimos utilizar una estrategia alternativa haciendo uso del alelo *tab6-1* (del inglés, *Telophase Arrest Bypassed*), que codifica una versión mutante de Cdc14 cuya afinidad por su inhibidor Net1/Cfi1 está disminuida (Shou et al., 2001). La expresión del alelo *tab6-1* en células *hit1Δ* mejoraba el crecimiento de este mutante, especialmente a temperaturas elevadas (Figura R9 A). Además, y remarcablemente, la expresión del alelo *tab6-1* era capaz de rescatar la letalidad sintética provocada por la ausencia simultánea de los genes *HIT1* y *LTE1* (Figura R9 B). Estos resultados están de acuerdo con que la letalidad sintética

de las células *hit1Δ lte1Δ* esté causada por su incapacidad de promover eficientemente la liberación de Cdc14 desde el nucléolo, y respaldan la hipótesis de que Hit1 sea necesaria para garantizar la liberación eficiente de esta fosfatasa en anafase temprana.

A



B

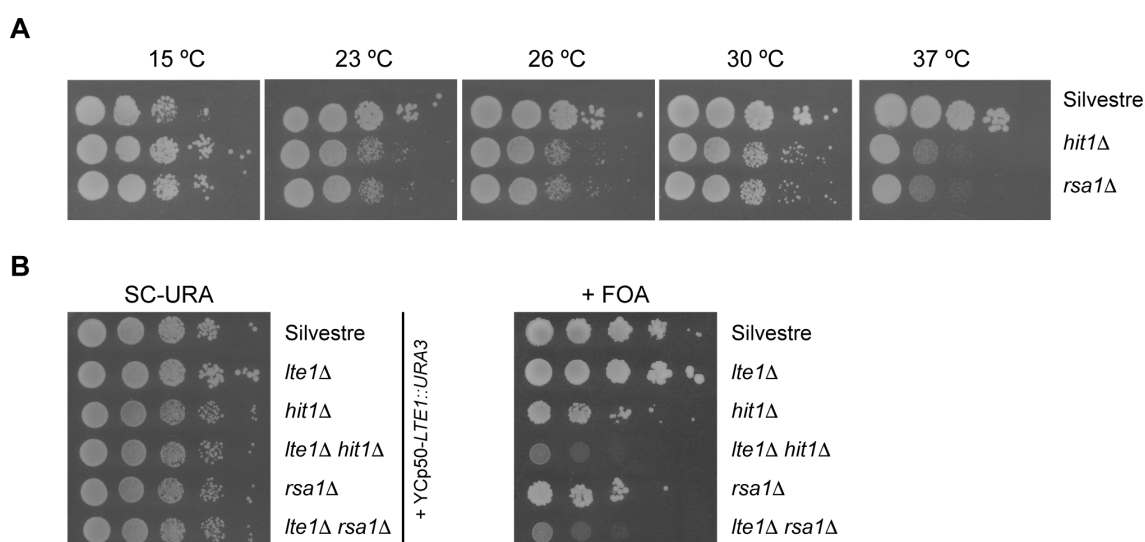


R9: La expresión del alelo *tab6-1* recupera la viabilidad de las células *hit1Δ lte1Δ*. Células del tipo silvestre (F496), y de los mutantes *hit1Δ* (F2000), *tab6-1* (F901) y *hit1Δ tab6-1* (F2383) se crecieron en placas de YPD partiendo de diluciones seriadas 1/10 en cultivo líquido ($DO_{600} = 0,3$). En cada caso, las placas se incubaron a la temperatura indicada. B) Células del tipo silvestre (F1312) y de los mutantes *lte1Δ* (F527), *tab6-1* (F2602), *hit1Δ* (F2065), *tab6-1 hit1Δ* (F2603), *hit1Δ lte1Δ* (F2061) y *tab6-1 hit1Δ lte1Δ* (F2601), todas ellas transformadas inicialmente con el plásmido centromérico Ycp50-*LTE1::URA3*, se cultivaron en placas de medio mínimo sin uracilo (SC-URA) o medio mínimo con FOA (0,3 mg/ml) (+FOA) a 23°C, partiendo de diluciones seriadas 1/10 ($DO_{600} = 0,5$).

3.4.1.1. La ausencia de *RSA1* provoca termosensibilidad y letalidad sintética en combinación con la falta de *LTE1*:

Los genes *HIT1* y *RSA1* están funcionalmente relacionados, ya que las proteínas que codifican forman parte de un mismo complejo que participa en el ensamblaje de snoRNPs C/D. Así, en nuestro interés por averiguar si la termosensibilidad y la letalidad sintética asociada a la falta combinada de *HIT1* y *LTE1* se deben exclusivamente a la delección del gen *HIT1*, o si estos fenotipos están asociados al funcionamiento incorrecto del complejo al que pertenece Hit1, realizamos ensayos de viabilidad con células *rsa1Δ*. Las células que carecen de *RSA1*, al igual que las que carecen de *HIT1* (Figura R4 E), también resultaron ser termosensibles y criorresistentes (Figura R10 A). Por otro lado,

y al igual de lo que ocurría en el caso de Hit1 (Figura R1 B), las células *rsa1Δ lte1Δ* que portaban el plásmido centromérico Ycp50-*LTE1::URA3*, eran incapaces de crecer en un medio con FOA (Figura R10 B). Por tanto, nuestros resultados indican que es la pérdida de función del complejo de ensamblaje de snoRNP C/D Hit1-Rsa1, y no la ausencia específica de *HIT1*, la que determina la letalidad sintética en células que además no expresan el gen *LTE1*.



R10: La ausencia de *RSA1* provoca termosensibilidad, y la falta combinada de este gen con *LTE1*, letalidad sintética. Células del tipo silvestre (F496), y de los mutantes *hit1Δ* (F2000) y *rsa1Δ* (F2613) se crecieron en placas de YPD partiendo de diluciones seriadas 1/10 en cultivo líquido ($DO_{600} = 0,3$). En cada caso, las placas se incubaron a la temperatura indicada. B) Células del tipo silvestre (F1312), y de los mutantes *lte1Δ* (F527), *hit1Δ* (F2065), *hit1Δ lte1Δ* (F2061) *rsa1Δ* (F2665) y *rsa1Δ lte1Δ* (2614), todas ellas transformadas con el plásmido centromérico Ycp50-*LTE1::URA3*, se crecieron en medio mínimo sin uracilo (SC-URA) o con FOA (0,3 mg/ml) (+FOA) a 23°C partiendo de diluciones seriadas 1/10 en medio líquido ($DO_{600} = 0,5$).

3.4.1.2. La ausencia de *HIT1* provoca hipercondensación nucleolar:

Una vez establecido que Hit1 es necesaria para la liberación correcta de Cdc14 durante anafase temprana, decidimos estudiar los mecanismos moleculares por los cuales este factor de ensamblaje de snoRNP afecta a la salida de mitosis. Así, y en primer lugar, analizamos si Hit1 y Cdc14 podían interactuar directamente. Con este fin, usamos un sistema de detección *in vivo* denominado ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC, del inglés, *Bimolecular Fluorescence Complementation Assay*) (Sung and Huh, 2007). Dicho ensayo permite detectar la interacción entre dos proteínas mediante la fusión de una de ellas con el extremo C-terminal de la proteína fluorescente

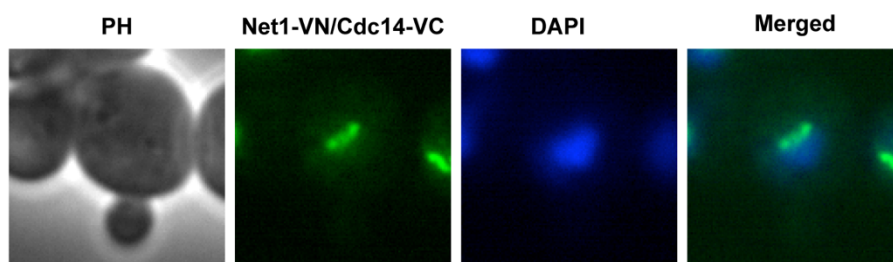
Venus (VC) y la fusión de la otra con el extremo N-terminal de Venus (VN). La interacción entre las dos proteínas fusionadas a los fragmentos de Venus se traduce en la reconstrucción de esta última molécula, dando lugar a un complejo fluorescente cuya localización subcelular puede monitorizarse directamente por microscopía.

Como control para los ensayos BiFC, corroboramos inicialmente la interacción de Cdc14 con su inhibidor, Cfi1/Net1, cuya asociación está ampliamente establecida en la bibliografía (Shou et al., 1999; Visintin et al., 1999). De acuerdo con estos datos previos, la fuerte interacción entre Cdc14 y Cfi1/Net1 daba lugar a una intensa señal fluorescente que se localizaba en el nucléolo de las células analizadas (Figuras R11 A y B). Una vez comprobada la utilidad de los ensayos BiFC para el estudio de interacciones en el contexto del nucléolo, analizamos la posible interacción de Hit1 con otras proteínas en este orgánulo celular. En ninguno de los ensayos usando Hit1 fusionada al dominio C-terminal de la proteína Venus (VC) se obtuvo señal fluorescente, probablemente debido a problemas con el plegamiento de la proteína, de forma que decidimos descartar el uso de esta quimera (Figura R11 A). Sin embargo, la fusión de Hit1 con el dominio N-terminal de Venus (VN) interaccionaba fuertemente con la proteína Nop1 fusionada a VC, y generaba una señal fluorescente restringida al nucléolo (Figuras R11 A y C). Aunque la interacción *in vivo* de Hit1 y Nop1 no ha sido previamente descrita, este resultado está de acuerdo con el hecho de que Nop1 ha sido aislada en purificaciones de afinidad en tándem usando Hit1 marcado con TAP (Rothe et al., 2014), e indica que Hit1-VN se expresa y localiza correctamente. Además, dicha interacción se mantenía constante a lo largo de todo el ciclo celular (Figuras R11 E y F), de acuerdo con nuestros resultados previos en los estudios de localización de Hit1. No obstante, y a pesar de que Hit1-VC resultaba ser funcional y localizarse correctamente, no observamos ninguna interacción clara entre esta quimera y Cdc14-VN o Net1-VN. Este resultado, junto con el hecho de que no hemos sido capaces de co-inmunoprecipitar Hit1 con Cdc14, sugiere, bien que Hit1 no interacciona directamente con Cdc14, o que esta interacción es transitoria o muy débil (Figura R11 D).

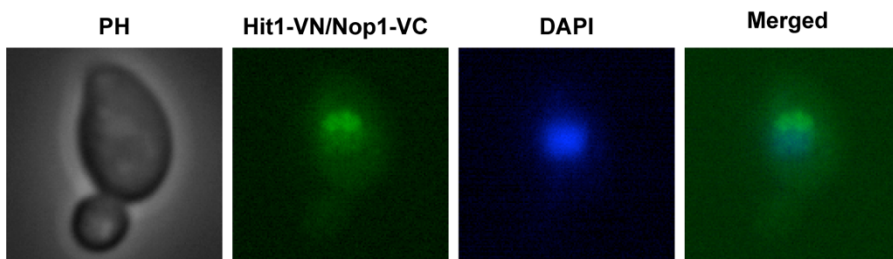
A

	Hit1-VC	Net1-VC	Cdc14-VC	Nop1-VC
Hit1-VN	n.d.	+	+	+++
Net1-VN	-	n.d.	+++	-
Cdc14-VN	-	+++	n.d.	+++
Nop1-VN	-	-	-	n.d.

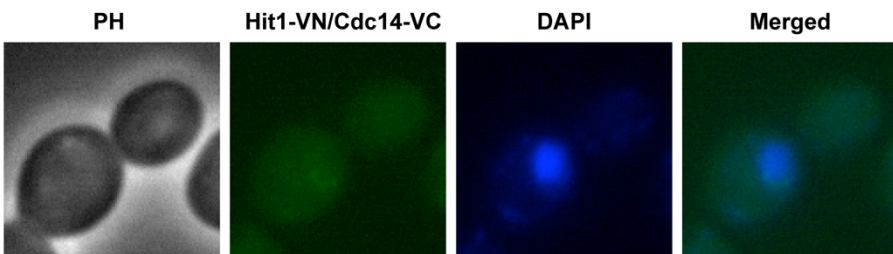
B



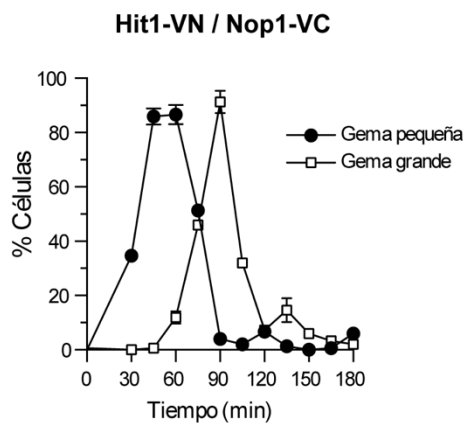
C



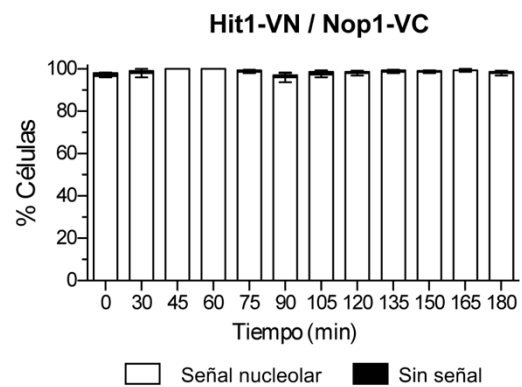
D



E



F



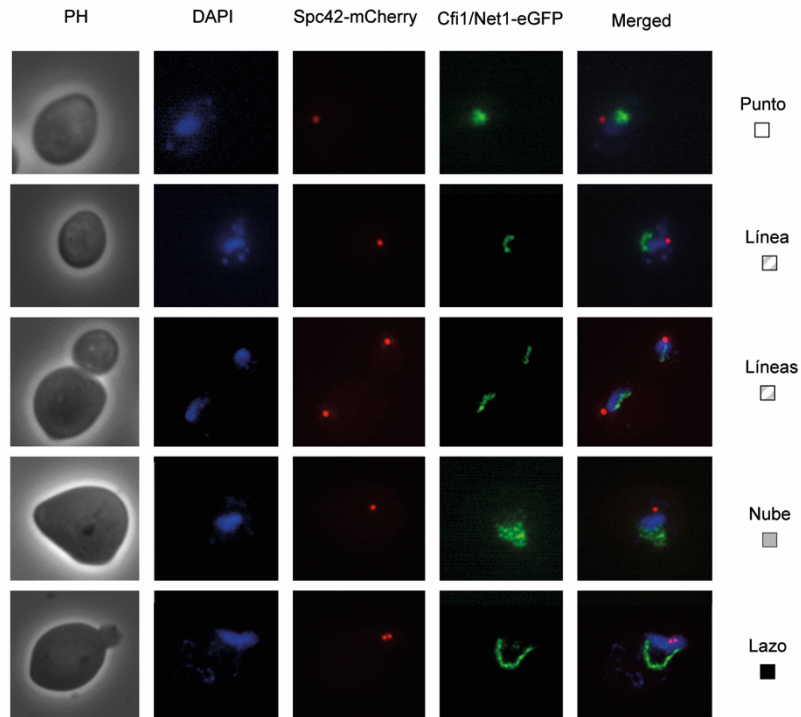
R11: Análisis de interacciones proteicas mediante ensayos BiFC. (A-D) Células que expresaban una fusión de Hit1, Cfi1/Net1, Cdc14 o Nop1 con el extremo N-terminal del dominio de la proteína

fluorescente Venus (VN) junto con una fusión de Hit1, Cfi1/Net1, Cdc14 o Nop1 con el extremo C-terminal del dominio de la proteína fluorescente Venus (VC), se crecieron en medio rico con adenina (300 µg/ml). (A) Tabla resumen de los resultados obtenidos con los ensayos BiFC. Para cada pareja de proteínas, se indica si el ensayo BiFC daba como resultado una señal fluorescente fuerte (+++) o débil (+), o si no se detectaba fluorescencia (-). Las combinaciones de proteínas que no se examinaron se indican como n.d (no determinadas). (B-D) Se muestra, en cada caso, la señal de Venus (en verde) y la morfología nuclear (DAPI, en azul), así como una imagen de contraste de fases (PH) y una superposición de las imágenes de fluorescencia (Merged). Se analizaron las interacciones entre Net1-VN y Cdc14-VC (F2566, B), Hit1-VN y Nop1-VC (F2247, C) y Hit1-VN y Cdc14-VC (F2539, D). (E, F) Células expresando simultáneamente Hit1-VN y Nop1-VC (F2247), se cultivaron a 26°C en YPD y se bloquearon en G1 con factor- α (5 µg/ml), tras lo cual las células se liberaron a 26°C en YPD sin feromona y con adenina (300 µg/ml) (t=0). (E) Porcentaje de células con gemas pequeñas y grandes a lo largo del ciclo celular, según el análisis de gemación determinado directamente mediante microscopía. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) (n=3). (F) Porcentaje de células que expresaban una señal fluorescente exclusivamente nucleolar (barras blancas) o ninguna señal fluorescente (barras negras). Las barras de error representan la SD (n=3).

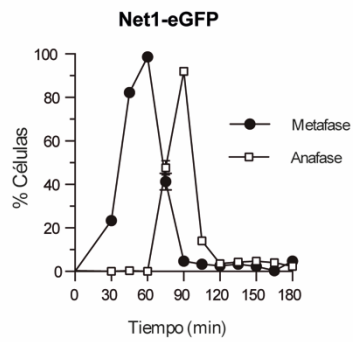
Independientemente de si Hit1 interactúa directamente o no con Cdc14, la ausencia de este factor de ensamblaje de snoRNPs C/D podría también interferir con la actividad de componentes conocidos de FEAR. Con el fin de estudiar esta posibilidad, analizamos si la ausencia de *HIT1* afectaba la localización o función de las proteínas Fob1 o Spo12 (Stegmeier et al., 2004). De forma interesante, y aunque no observamos ninguna evidencia de defectos de localización de Fob1, proteína que aún se restringía al nucléolo en células *hit1* Δ , observamos que este compartimento subcelular presentaba una morfología más compacta en este mutante que en células de tipo silvestre, lo cual podría ser un indicativo de hiper-condensación del ADNr.

En la levadura de gemación, el ADNr se condensa totalmente en anafase, más tarde que la mayoría del resto de regiones cromosómicas (D'Amours et al., 2004; Lavoie et al., 2004; Sullivan et al., 2004). La compactación de este locus puede analizarse visualizando la localización de proteínas que se unen al mismo, como Cfi1/Net1 o Fob1 (Machin et al., 2005; Stegmeier et al., 2002; Straight et al., 1999; Torres-Rosell et al., 2004). El locus del ADNr experimenta una transformación, que depende de la actividad de las condensinas, desde una estructura poco organizada en interfase a una estructura altamente ordenada durante mitosis (Hiraoka et al., 1989; Manders et al., 1999). Se trata de estados morfológica y bioquímicamente distintos que podemos categorizar en niveles progresivos de organización cromosómica (Lavoie et al., 2004). Entre estos estados, las líneas anafásicas representan la categoría que supone una mayor compactación del nucléolo (Machin et al., 2005) (Figuras R12 A y R12 F).

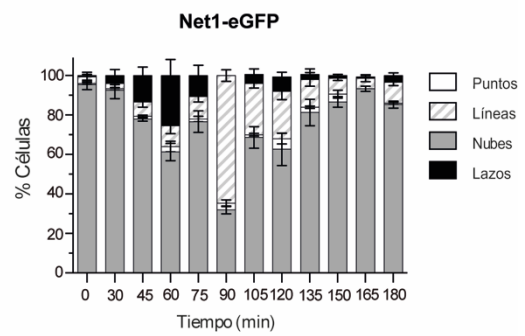
A



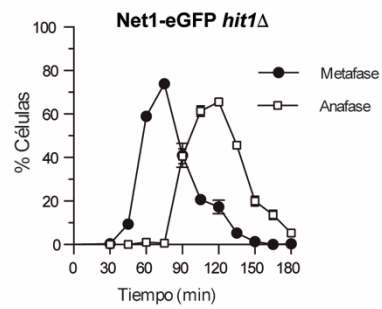
B



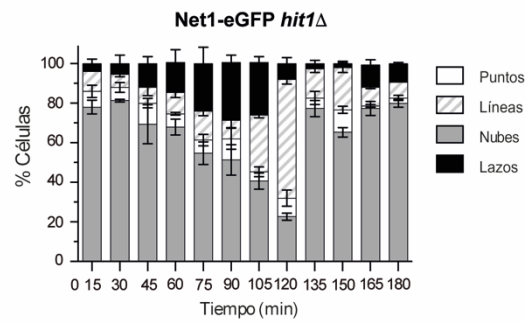
C

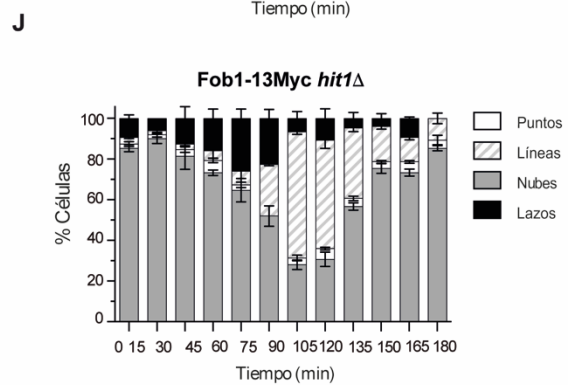
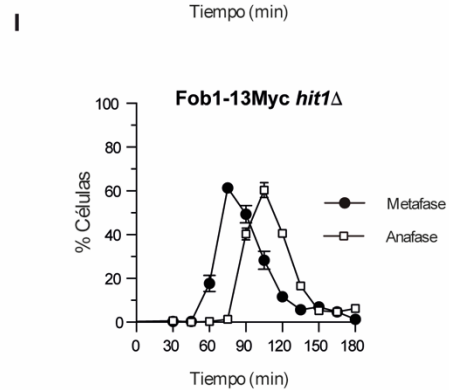
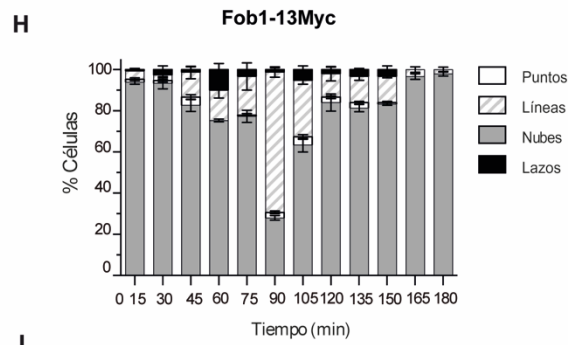
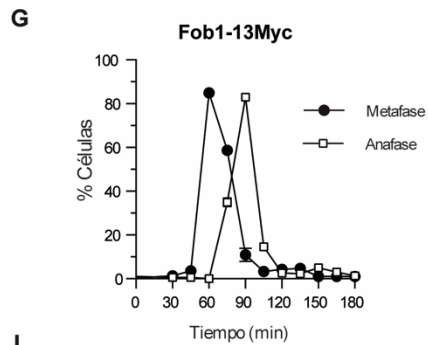
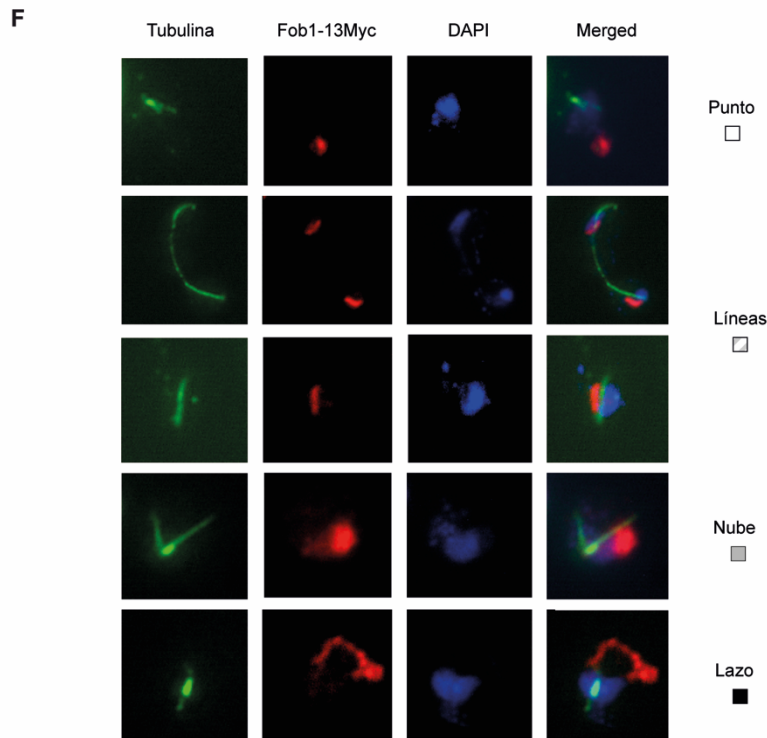


D



E





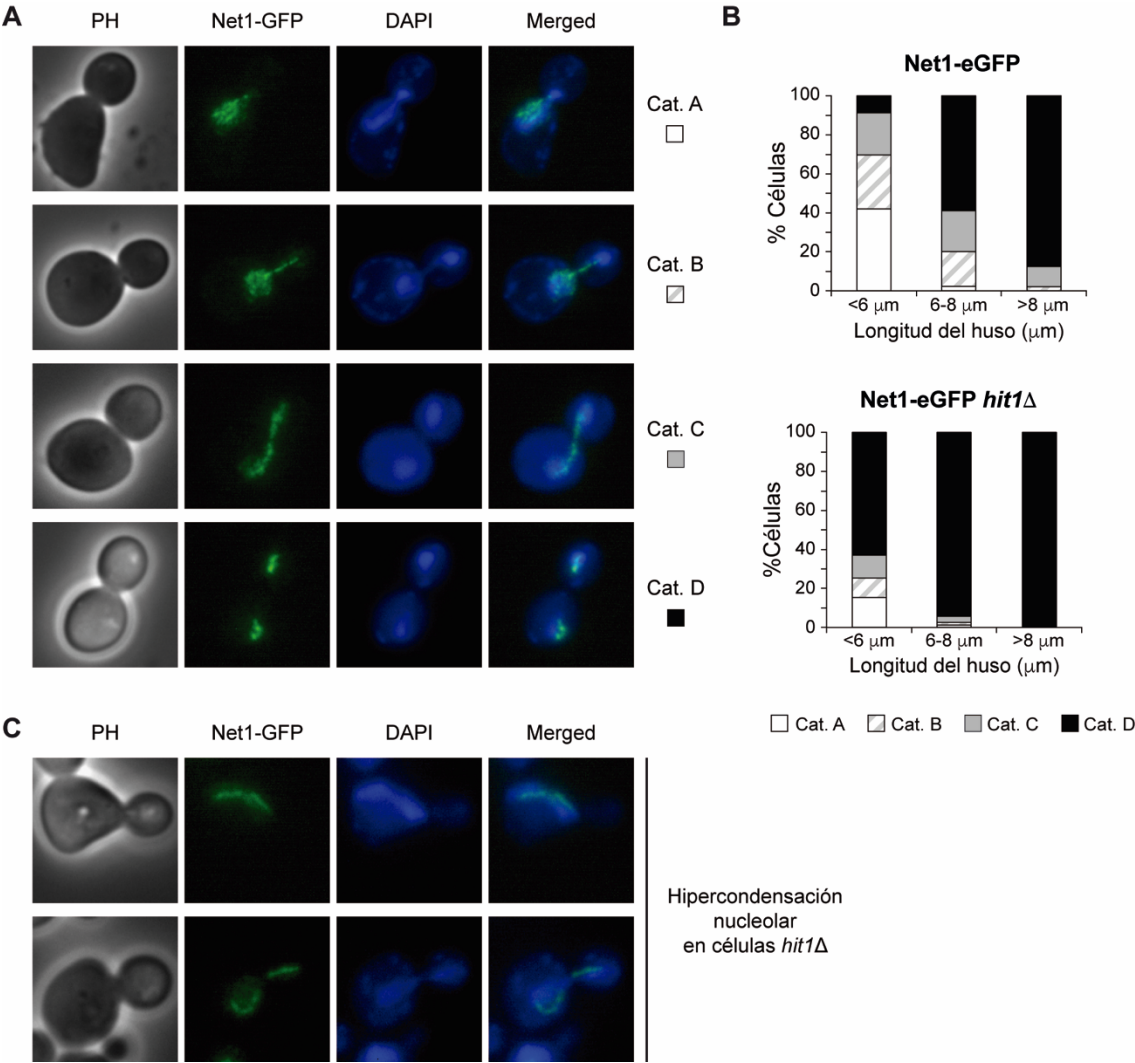
R12: Morfología nucleolar en células *hit1* Δ a lo largo del ciclo celular. (A-E) Células del tipo silvestre (F2301) y células *hit1* Δ (F2303), ambas expresando una versión marcada de Cfi1/Net1 con eGFP y Spc42 con m-Cherry, se crecieron en YPD con adenina (300 μ g/ml) a 26°C, se bloquearon en G1 con factor- α (5 μ g/ml), y se liberaron en YPD sin feromona a 26°C. (A) Imágenes de células representativas de cada categoría de condensación nucleolar (puntos, líneas, nubes y lazos). Se

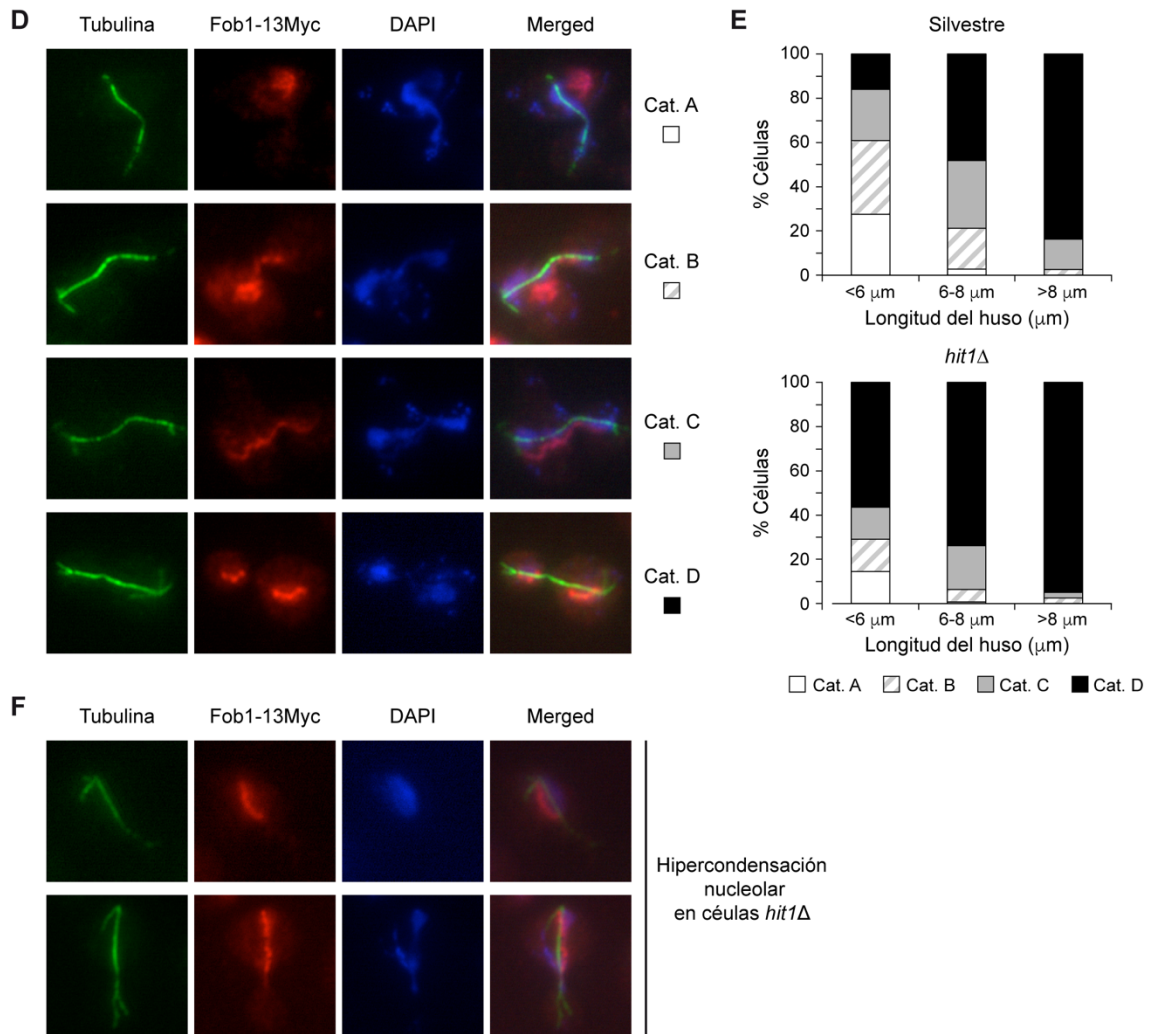
muestra la morfología tanto nuclear (DAPI, en azul) como nucleolar (Net1-GFP, en verde) y los SPBs (Spc42-mCherry, en rojo), así como la morfología celular (PH) e imágenes superpuestas (Merged). (B,D) Porcentaje de células con gemas pequeñas y grandes a lo largo del ciclo celular, determinado directamente mediante microscopía. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) (n=3). (F-J) Células del tipo silvestre (F2080) y del mutante *hit1Δ* (F2078), expresando en ambos casos una versión marcada de Fob1 con 13Myc, se crecieron a 23°C en YPD, se arrestaron en G1 con factor- α (5 μ g/ml) y se liberaron en YPD sin feromona a 26°C. (F) Imágenes de células representativas de cada categoría de condensación nucleolar (puntos, líneas, nubes y lazos). Se muestra la morfología tanto nuclear (DAPI, en azul) como nucleolar (Fob1-13Myc, en rojo), el huso (tubulina, en verde) e imágenes superpuestas (Merged). (G,I) Porcentaje de células en metafase y anafase determinados tras la liberación del bloqueo en G1, obtenidos mediante el análisis de la morfología nuclear y del huso mitótico usando inmunofluorescencia. Las barras de error se corresponden con la SD (n=3). (C, E, H, J) Porcentaje de células con una morfología nucleolar en forma de punto (barras blancas), nube (barras grises), línea (barras rayadas) o lazo (barras negras). Las barras de error representan la SD (n=3).

En base a nuestros resultados anteriores, llevamos a cabo un estudio del grado de condensación del nucléolo a lo largo del ciclo celular en células que expresaban una versión de Cfi1/Net1 marcada con eGFP. El análisis de la morfología del nucléolo en células *hit1Δ* mostraba, independientemente de la fase del ciclo, un mayor porcentaje de células incluidas en categorías que se corresponden con una elevada condensación nucleolar en comparación con las células del tipo silvestre (Figuras R12 A-E). Con el fin de reforzar estas observaciones, llevamos a cabo un análisis similar usando células que expresaban una versión de Fob1 marcada con el epítipo 13Myc. Los resultados de este último análisis también indicaban un grado mayor de condensación del nucléolo en células que no expresaban *HIT1* en comparación con el tipo silvestre (Figuras R12 F-J).

En resumen, por tanto, nuestros datos sugieren que las células *hit1Δ* presentan una mayor condensación del nucléolo en todas las fases del ciclo en comparación con células del tipo silvestre. Para estudiar específicamente el grado de compactación de este orgánulo durante el proceso de salida de mitosis, decidimos realizar un estudio adicional centrándonos exclusivamente en la transición metafase-anafase. En este caso, usamos un ensayo previamente descrito en el que las células se clasifican en cuatro categorías diferentes, cronológicamente ordenadas, y representativas de distintos estados de condensación, que van desde un estadio menos condensado (categoría A) al de máxima condensación (categoría D) (Geil et al., 2008) (Figuras R13 A y D). De acuerdo con nuestras observaciones previas, el locus del ADN_r también se muestra prematuramente hiper-condensado en las células *hit1Δ* durante la transición metafase-anafase, observándose en este mutante un número elevado de células que

alcanzan la máxima condensación del ADNr (categoría D) cuando el huso es menor de 6 μm , a diferencia de las células de la estirpe silvestre, que normalmente muestran una condensación nucleolar máxima con husos mayores de 8 μm (Figuras R13 B, C, E y F). Es importante resaltar que, de nuevo, los datos obtenidos son similares usando como marcador nucleolar tanto la localización de Cfi1/Net1 como la de Fob1 (Figuras R13 A-F).



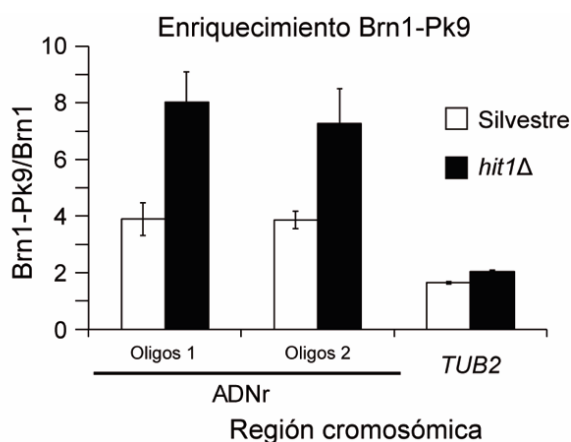


R13: Hiper-condensación del nucleolo en células *hit1Δ* durante la transición metafase-anafase.

(A-C) Células del tipo silvestre (F2168) y del mutante *hit1Δ* (F2169), expresando una versión marcada de Cfi1/Net1 con eGFP, se crecieron en YPD con adenina (300 μg/ml) a 26°C, se bloquearon en G1 con factor-α (5 μg/ml) y se liberaron en YPD sin feromona a 26°C. (A, C) Se muestran imágenes de la morfología nuclear (DAPI, en azul) y nucleolar (Net1-GFP, en verde), la morfología celular (PH) y las imágenes superpuestas (Merged). (B) Porcentaje de células de cada categoría de compactación nucleolar (Cat. A-D) en función del tamaño del huso mitótico. (D-F) Células del tipo silvestre (F2080) y del mutante *hit1Δ* (F2078), todas ellas expresando una versión marcada de Fob1 con 13Myc, se crecieron a 23°C en YPD, se bloquearon en G1 con factor-α (5 μg/ml) y se liberaron en medio YPD sin feromona a 26°C. (D, F) Se muestran imágenes de la morfología nuclear (DAPI, en azul) y nucleolar (Fob1-13Myc, en rojo), el huso mitótico (tubulina, en verde) y las imágenes superpuestas (Merged). (E) Porcentaje de células de cada categoría de compactación nucleolar (Cat. A-D) en función del tamaño del huso mitótico.

Para evaluar si el elevado grado de compactación del nucléolo en el mutante *hit1Δ* se corresponde con una mayor carga de condensinas en el locus del ADNr, llevamos a cabo ensayos de inmuno-precipitación de la cromatina (ChIP) en células que

expresaban una versión marcada de Brn1, una subunidad del complejo condensina, con el epítipo Pk9. En concordancia con nuestras observaciones previas, la ausencia de *HIT1* provocaba un incremento en la asociación de condensinas con el locus del ADNr (Figura R14). Si bien el incremento es pequeño, es importante señalar que previamente se ha demostrado que incluso una duplicación de los niveles de condensinas puede afectar sustancialmente la condensación nucleolar (Lavoie et al., 2004). Nuestros resultados sugieren, por tanto, que la pérdida de *HIT1* facilita la accesibilidad de la condensina al locus del ADNr, causando una hipercondensación prematura del nucléolo.



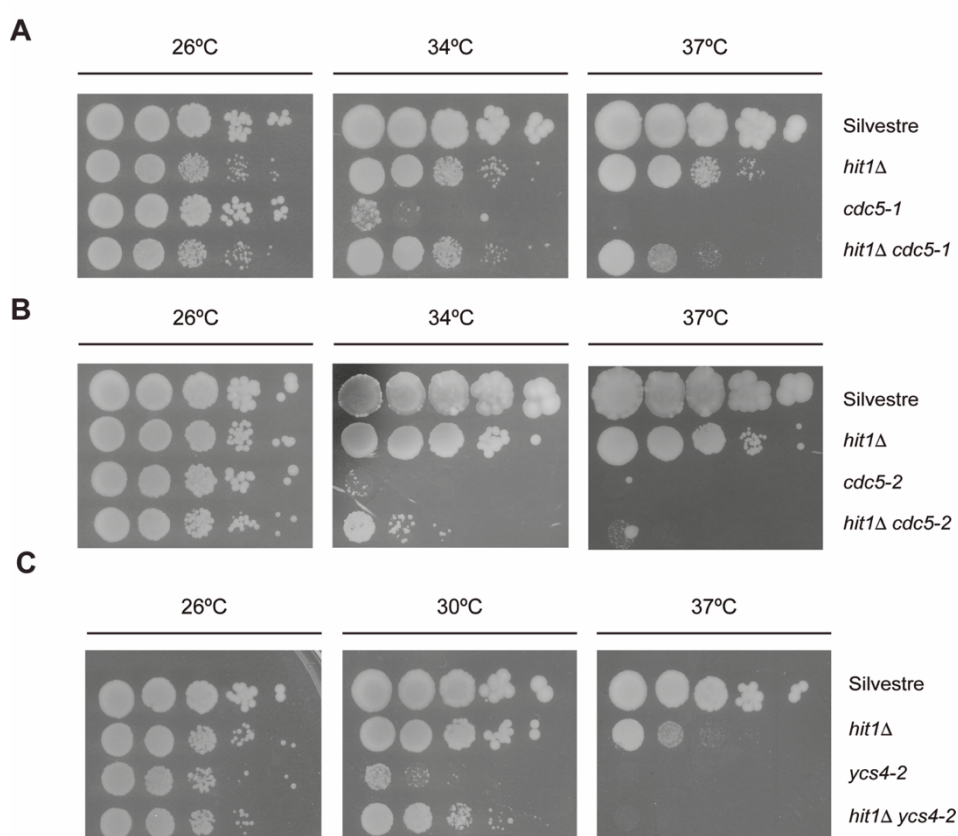
R14: Las células *hit1Δ* presentan un mayor enriquecimiento de condensinas en el ADNr.

Análisis de la asociación de condensinas en el locus del ADNr en células del tipo silvestre (F2702) y del mutante *hit1Δ* (F2730) que expresan una versión marcada de Brn1 con el epítipo PK9. El enriquecimiento de condensinas en el locus del ADNr se determinó mediante análisis de inmuno-precipitación de cromatina (ChIP) y PCR a tiempo real, usando parejas de oligos para dos regiones diferentes en la región 5'UTR del gen *RDN37*. Como control negativo se utilizó una pareja de oligos específica para el gen *TUB2*. El enriquecimiento de condensinas en cada región se calculó como la proporción entre el total (input) y el inmunoprecipitado en las estirpes marcadas relativa a la misma proporción en una estirpe sin marcar (F496). Las barras de error representan el error estándar de la media, SEM (n=3).

3.5. La liberación deficiente de Cdc14 en células que carecen de *HIT1* puede rescatarse aliviando la hipercondensación nucleolar:

Los resultados anteriormente descritos sugieren que el retraso en salida de mitosis observado en el mutante *hit1Δ* podría deberse a que la hiper-condensación prematura del nucléolo que muestran estas células impide que la fosfatasa Cdc14 pueda liberarse de forma eficiente desde este orgánulo durante las primeras etapas de anafase. Una

predicción de esta hipótesis, es que mitigando la hiper-condensación nucleolar en células *hit1Δ* debería restaurarse la liberación eficiente de Cdc14 en la transición metafase-anafase. Para evaluar esta posibilidad, analizamos el efecto de la ausencia de Hit1 sobre la viabilidad de células que presentan una estructura nucleolar más laxa o descondensada, tales como las de los mutantes que portan alelos termosensibles de los genes *CDC5* o *YCS4*.

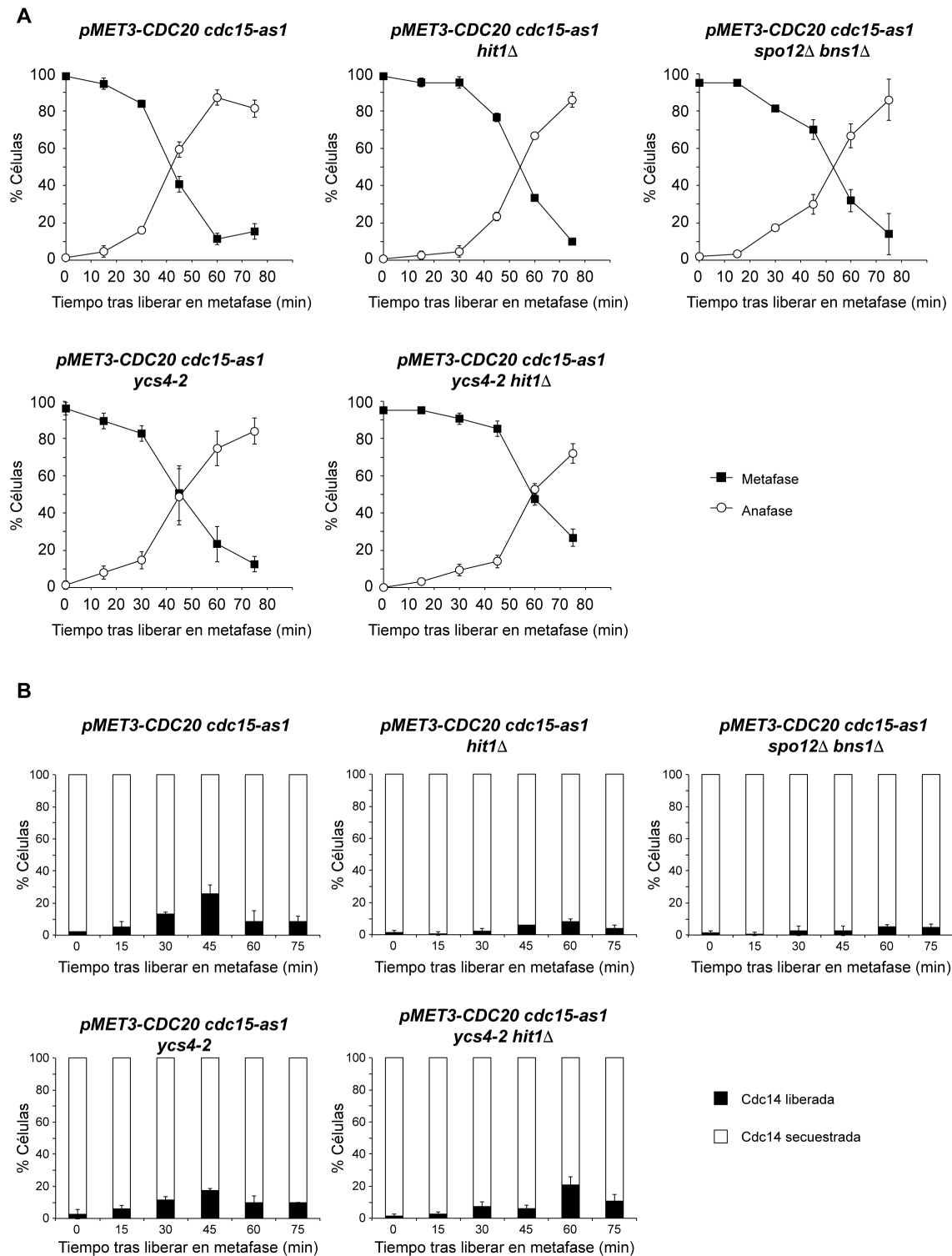


R15: La ausencia de *HIT1* restaura la viabilidad de las células que portan alelos termosensibles de *CDC5* o *YCS4*. (A) Células del tipo silvestre (F496), y de los mutantes *hit1Δ* (F2000), *cdc5-1* (F2038) y *cdc5-1 hit1Δ* (F2642) se crecieron en placas de YPD a partir de diluciones seriadas 1/10 en cultivo líquido ($DO_{600} = 0,3$) a la temperatura indicada en cada caso. (B) Células del tipo silvestre (F496), y de los mutantes *hit1Δ* (F2000), *cdc5-2* (F2087) y *cdc5-2 hit1Δ* (F2690) se crecieron en placas de YPD a partir de diluciones seriadas 1/10 en cultivo líquido ($DO_{600} = 0,3$) a la temperatura indicada en cada caso. (C) Células del tipo silvestre (F496), y las mutantes *hit1Δ* (F2000), *ycs4-2* (F2767) y *hit1Δ ycs4-2* (F2810) se crecieron en placas de YPD, a la temperatura indicada en cada caso, partiendo de diluciones seriadas 1/10 de un cultivo líquido ($DO_{600} = 0,3$).

En primer lugar, realizamos estudios de viabilidad con células que portaban alelos mutantes de *CDC5*. La polo quinasa Cdc5 regula la forma que adopta el núcleo mitótico (Walters et al., 2014), y también regula la función de las condensinas mediante su

modificación postraducciona (St-Pierre et al., 2009). De forma interesante, la delección de *HIT1* era capaz de rescatar parcialmente la viabilidad de los mutantes *cdc5-1* y *cdc5-2* a temperaturas elevadas (Figuras R15 A y B). Este resultado refuerza nuestra hipótesis de que la hiper-condensación del nucléolo causada por la ausencia de *HIT1* provoca una liberación eficiente de Cdc14 desde este orgánulo.

Por otro lado, también realizamos ensayos de viabilidad utilizando células que portaban el alelo termosensible *ycs4-2*, que codifica una versión mutante de la subunidad reguladora del complejo condensina Ycs4 (Lavoie et al., 2002). Remarcablemente, las células *hit1Δ ycs4-2* mostraban una viabilidad mayor que las células *ycs4-2* a temperatura semipermissiva (Figura R15 C). Este resultado, de nuevo, apoya que sea la hiper-condensación nucleolar causada por la falta de expresión de *HIT1* la que provoque defectos en salida de mitosis debido a que dificulta la liberación de la fosfatasa Cdc14 durante las primeras etapas de anafase. Para reforzar aún más nuestra hipótesis, analizamos finalmente si el defecto de la liberación de Cdc14 dependiente de FEAR que observamos en las células *hit1Δ* puede prevenirse aliviando la condensación del nucléolo con la introducción del alelo *ycs4-2*. Para ello, y de forma similar a lo descrito en el apartado 3.4.1 (Figura R7), analizamos la localización de Cdc14 en células *pMET-CDC20 cdc15-as1* liberadas de un bloqueo previo en metafase y en las que, adicionalmente, la actividad de la ruta MEN era impedida para poder estudiar la liberación de la fosfatasa dependiente exclusivamente de la ruta FEAR. Dicho análisis demostraba que, a diferencia de lo observado previamente con células *pMET-CDC20 cdc15-as1 hit1Δ* o células *pMET-CDC20 cdc15-as1 spo12Δ bns1Δ*, que son incapaces de liberar Cdc14, la introducción del alelo *ycs4-2* en el mutante *pMET-CDC20 cdc15-as1 hit1Δ* permitía restaurar la liberación temprana de la fosfatasa (Figuras R16 A y B).



en medio mínimo sin metionina y con 1-NA-PP1 10 μ M. (A) Análisis de la progresión del ciclo celular mediante el estudio de la morfología del huso y del núcleo. Para cada punto, se representan los porcentajes de células en metafase y anafase. Las barras de error representan la SD (n=3). (B) Porcentajes de células que muestran Cdc14 secuestrada (barras blancas) o liberada del nucléolo (barras negras) para cada punto, determinados mediante inmunofluorescencia. Las barras de error representan la SD (n=3).

En resumen, el conjunto de todos los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral demuestran que la falta de funcionalidad de *HIT1* determina una hipercondensación prematura del ADNr que, a su vez, impide la liberación eficiente de la fosfatasa Cdc14 desde el nucléolo durante las etapas iniciales de la anafase, haciendo que las células *hit1* Δ (al igual que las del mutante *rsa1* Δ) sean altamente dependientes de la actividad de Lte1 para que pueda tener lugar, de forma eficiente, la salida de mitosis.

4. DISCUSIÓN:

4.1. Los factores de ensamblaje de snoRNPs C/D Hit1 y Rsa1 son necesarios para el correcto control del ciclo celular:

Hit1 se ha identificado recientemente como un nuevo factor involucrado en el ensamblaje de las snoRNPs C/D en *Saccharomyces cerevisiae*, un proceso de enorme importancia para la biogénesis de ribosomas. Hit1, junto con Rsa1 y Snu13, forma un heterodímero que estabiliza a los snoARNs C/D, facilitando la cinética de maduración de los pre-ARNr (Rothe et al., 2014). La proteína Hit1 es necesaria para mantener niveles constantes de Rsa1 (Rothe et al., 2014), y de acuerdo con esto, y con que formen parte del mismo complejo, las células carentes de *HIT1* o *RSA1* presentan fenotipos similares. Así, los mutantes que carecen de estos factores de ensamblaje presentan problemas de crecimiento semejantes que, además, se acentúan con el aumento de la temperatura. El retraso en el crecimiento celular de los mutantes *hit1Δ* o *rsa1Δ* se había asociado a que ambos presentan, por lo general, niveles más bajos de snoARNs C/D (Rothe et al., 2014), lo que se asocia a una reducción en las etapas de maduración de los pre-ARNr, y determina un retraso en la biogénesis de ribosomas funcionales. A temperaturas elevadas, además, se reprime la síntesis de proteínas debido a una ralentización de la elongación de la traducción (Shalgi et al., 2013) y se produce una represión de los genes que codifican las proteínas ribosómicas, disminuyendo las cantidades de sus ARNm (Miyoshi et al., 2003; Warner, 1999; Warner and Gorenstein, 1977), lo cual podría explicar el agravamiento del defecto de crecimiento asociado a la delección de *HIT1* o *RSA1* con el incremento de la temperatura.

En esta Tesis Doctoral, hemos demostrado que la ausencia de *HIT1* determina, además de problemas de viabilidad celular como consecuencia de los defectos en la biogénesis de ribosomas previamente descritos, un retraso generalizado del ciclo celular. Así, un análisis exhaustivo utilizando marcadores moleculares (degradación de Pds1 o Clb2) y estudiando directamente la liberación de la fosfatasa Cdc14, nos ha permitido demostrar que la ausencia de este gen causa defectos en la progresión del ciclo celular que afectan a todas las fases del mismo, pero que interfieren específicamente con el proceso de salida de mitosis. De acuerdo con un papel específico en la regulación de la función de Cdc14 durante la salida de mitosis, la ausencia simultánea de los genes *HIT1* (o *RSA1*) y *LTE1*, el activador de la ruta MEN, determina letalidad sintética ((Ye et al., 2005), y los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral). Este hecho es muy interesante, pues la letalidad sintética con *lte1Δ* es una característica compartida por los mutantes que

muestran problemas en la liberación de Cdc14 desde el nucléolo durante los estadios iniciales de anafase, dependiente de la ruta FEAR (Stegmeier and Amon, 2004). Adicionalmente, y como ocurre con mutantes en distintos componentes de FEAR necesarios para la activación de esta ruta, nuestros resultados demuestran que la letalidad sintética entre *hit1Δ* y *lte1Δ* es rescatada por la delección adicional de *BFA1*, que codifica un inhibidor de la ruta de salida de mitosis. De hecho, esta es una característica que se ha utilizado previamente como una estrategia para la búsqueda de nuevos componentes de la ruta FEAR (Stegmeier et al., 2002). Partiendo de esta observación, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos demostrado que Hit1 es necesaria para promover la liberación eficiente de Cdc14 mediada por FEAR en la transición metafase-anafase y, por tanto, para el correcto desarrollo de la función de esta fosfatasa promoviendo eventos clave durante las etapas iniciales de anafase. El retraso en la liberación dependiente de la ruta FEAR de la fosfatasa Cdc14 causado por la falta de expresión de *HIT1* hace que el mutante *hit1Δ* sea muy dependiente de la funcionalidad de la ruta MEN, y más concretamente de la función activadora de *Lte1*, para promover finalmente la liberación de Cdc14 de su inhibidor Cfi1/Net1 y la salida de mitosis. De acuerdo con esto, la expresión del alelo *tab6-1*, que codifica una versión mutante de Cdc14 con una afinidad reducida por Cfi1/Net1 (Shou et al., 2001), permite recuperar la letalidad sintética causada por la ausencia simultánea de *HIT1* y *LTE1*. Este resultado sugiere que la liberación deficiente de Cdc14 observada en el mutante *hit1Δ* podría deberse a que, en estas células, se dificulta la disociación de la fosfatasa de su inhibidor Cfi1/Net1, manteniéndose así el secuestro de Cdc14 en el nucléolo.

De forma interesante, los defectos observados durante la progresión del ciclo celular en las células que carecen de *HIT1*, a diferencia de lo que ocurre con los defectos de crecimiento, no se agravan con el aumento de la temperatura. Por tanto, la termosensibilidad mostrada por las células *hit1Δ* debe asociarse, posiblemente, a problemas adicionales generados por la ausencia de este factor de ensamblaje de snoRNPs C/D, que son independientes de la función que Hit1 desempeña en la regulación del ciclo celular y, más concretamente, en la correcta liberación de Cdc14.

Por otro lado, y aunque nuestros resultados muestran claramente que la función de Hit1 es necesaria para que se lleve a cabo correctamente la liberación de Cdc14 mediada por FEAR, la sobreexpresión de *HIT1*, a diferencia de lo que ocurre con la de otros componentes de esta ruta de señalización (Jaspersen et al., 1998; Stegmeier et al., 2002; Visintin et al., 2003), no rescata la viabilidad de mutantes deficientes en la ruta MEN. Es importante señalar, sin embargo, que la sobreexpresión de *HIT1* por sí sola

determina problemas de viabilidad celular. Por tanto, y al igual que ocurre con la termosensibilidad, la incapacidad de rescatar la viabilidad de los mutantes MEN podría estar asociada a que la sobreexpresión de *HIT1* provoca problemas adicionales, no directamente relacionados con el posible papel de esta proteína en la regulación de la localización de Cdc14, que impiden el crecimiento de las células. En este sentido, es importante resaltar que los transcritos del ARNr por sí solos, al igual que los factores de ensamblaje, estabilizan las uniones del ADNr, perjudicando la segregación de esta parte del genoma ya que, para que segregue correctamente, es necesario eliminarlas previamente (Tomson et al., 2006).

Nuestros resultados, en conjunto, demuestran que errores durante el ensamblaje de las snoRNPs C/D pueden traducirse en una liberación deficiente de Cdc14 durante las etapas iniciales de anafase, y nos permiten establecer un nuevo nexo de unión entre factores de ensamblaje de ribosomas y la regulación de salida de mitosis.

4.2. El ensamblaje de snoRNPs C/D y la maduración del ADNr interfieren con la condensación nucleolar:

La localización subcelular de Hit1 se restringe tanto al núcleo como al nucléolo, lo cual está de acuerdo con la función propuesta para esta proteína en el control de la liberación temprana de la fosfatasa Cdc14 mediada por la ruta FEAR. Sin embargo, los experimentos realizados *in vivo* mediante ensayos BiFC no parecen sugerir que este papel esté mediado por una interacción directa entre Hit1 y Cdc14, sino que apoyan la hipótesis alternativa de que Hit1 regule la liberación de la fosfatasa desde el nucléolo de forma indirecta. De acuerdo con esta observación, los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral nos han permitido demostrar que el defecto en el ensamblaje de snoRNPs C/D como consecuencia de la falta de funcionalidad del complejo Hit1-Rsa1-Snu13 provoca una hiper-condensación prematura del ADNr. Esta hiper-condensación del ADNr en el mutante *hit1Δ*, a su vez, determina una estructura más compacta del nucléolo que impide que Cdc14 pueda liberarse de forma eficiente desde este compartimento celular. Así, y mediante el uso de marcadores nucleolares, como las proteínas Cfi1/Net1 y Fob1, hemos demostrado que el ADNr de las células *hit1Δ* está hiper-condensado en todas las fases del ciclo celular y, de forma específica, en la transición metafase-anafase. Estos ensayos se ven confirmados por análisis posteriores de inmuno-precipitación de cromatina (ChIP) que demuestran que la ausencia de *HIT1* facilita la accesibilidad de las subunidades condensina al locus del ADNr. Nuestros

datos están de acuerdo con el hecho de que la arquitectura nucleolar se considere prácticamente una consecuencia del proceso de biogénesis de ribosomas (McStay, 2016) y, adicionalmente, nos permiten demostrar que, no sólo la transcripción del ARNr, sino también la propia maduración del ARNr y el ensamblaje de snoRNPs pueden interferir en la condensación del nucléolo. De forma interesante, estas observaciones coinciden con estudios previos en ratón que indican que componentes de las snoRNPs C/D, (p55 y p50), podrían coordinar el ensamblaje de snoRNPs con el remodelado de la cromatina (Lavoie et al., 2002).

En *S. cerevisiae*, las subunidades del complejo condensina sufren modificaciones postraduccionales dependientes de ciclo, que incluyen su fosforilación (Tsang et al., 2007). Dichas modificaciones son necesarias para la activación de estas proteínas (St-Pierre et al., 2009). De este modo, un mutante que porta alelos fosfomutantes de las tres subunidades reguladoras del complejo condensina (Brn1, Ycg1 e Ycs4) presenta una morfología nucleolar más laxa en anafase, que se corresponde con una falta de activación de condensinas, cuyas subunidades no se cargan en el ADNr (St-Pierre et al., 2009). Estas tres subunidades del complejo condensina son fosforiladas directamente por la polo-quinasa Cdc5 (Bazile et al., 2010; Lavoie et al., 2004; St-Pierre et al., 2009). Por tanto, el hecho de que la viabilidad de células que portan los alelos termosensibles *cdc5-1* o *cdc5-2* sea parcialmente rescatada a temperaturas elevadas por la delección de *HIT1* está de acuerdo con nuestra hipótesis de que la ausencia de este factor de ensamblaje de snoRNP C/D determina una hiper-condensación del nucléolo como consecuencia de una mayor carga de condensinas activas en este lugar del genoma. Si bien, como hemos comentado, la recuperación de la viabilidad observada en las células *cdc5-1* o *cdc5-2* tras la delección de *HIT1* es parcial, pues es importante señalar que existen otras proteínas involucradas en la activación de las subunidades condensinas, como CDK1, Cdc14 o Ipl1 (Bazile et al., 2010; D'Amours et al., 2004; Lavoie et al., 2004; St-Pierre et al., 2009). Por otro lado, hay que tener también en cuenta que Cdc5 tiene un gran número de funciones adicionales. Así, además de regular la forma que adopta el núcleo mitótico (Walters et al., 2014), Cdc5 forma parte tanto de la ruta FEAR como de la ruta MEN, y juega un papel importante en la liberación de Cdc14 durante las primeras etapas de anafase, así como en el mantenimiento posterior de esta liberación durante anafase tardía (Rodríguez-Rodríguez et al., 2016). En concreto, Cdc5 se comporta como un regulador positivo de la ruta FEAR (Faust et al., 2013), promoviendo la fosforilación de Cfi1/Net1 y de Cdc14, y facilitando así la

liberación de la fosfatasa de su inhibidor (Liang et al., 2009a; Rock and Amon, 2009). Por otro lado, Cdc5 también permite la activación de la ruta MEN fosforilando, e inhibiendo de este modo, a Bfa1-Bub2, un complejo que regula negativamente esta cascada de señalización (D'Amours and Amon, 2004).

Finalmente, nuestras conclusiones anteriores en relación al impacto que la ausencia de *HIT1* presenta sobre el proceso de condensación nucleolar se ven reforzadas gracias al uso del alelo *yca4-2*, que codifica una versión termosensible de la subunidad Yca4 del complejo condensina. La expresión del alelo *yca4-2* determina un defecto en la condensación nucleolar en las células que lo portan, incluso a temperatura permisiva (23°C) (Wang et al., 2016). Nuestros resultados indican que la introducción de dicho alelo rescata la liberación deficiente de Cdc14 desde el nucléolo durante los estadios iniciales de anafase en células *hit1Δ*, de acuerdo con el hecho de que la falta de expresión de *HIT1* determine una hiper-condensación prematura del ADNr que afecta a la liberación de la fosfatasa Cdc14 desde el nucléolo.

En conjunto, nuestros datos sugieren, por tanto, que los problemas de crecimiento y los defectos sobre el ciclo celular observados en las células *hit1Δ*, y más concretamente aquellos referidos al proceso de salida de mitosis, no se deben meramente a la remodelación del nucléolo como consecuencia de los defectos causados por la biogénesis de ribosomas y procesamiento del ADNr, sino que están específicamente asociados a problemas con el proceso de condensación cromosómica. La ausencia del factor de ensamblaje de snoRNPs C/D Hit1 provoca que las subunidades condensinas se concentren en su forma activa en el ADNr, hiper-condensando esta región del genoma. Dicha hiper-condensación nucleolar determina la retención de la fosfatasa Cdc14, impidiendo su liberación eficiente en los estadios iniciales de anafase y causando, con ello, un retraso en la salida de mitosis. Estos problemas en la liberación de Cdc14 explican la observación inicial de que la ausencia conjunta de *HIT1* y *LTE1* conduce a letalidad sintética. Es importante señalar, por otro lado, que los problemas en la liberación de Cdc14 generados por la hiper-condensación que determina la falta de Hit1 podrían verse agravados en las células *hit1Δ lte1Δ* por el hecho de que la ausencia de Lte1 determina un retraso en la liberación de Brn1 (subunidad no-SMC del complejo condensina) del ADNr en anafase tardía (Varela et al., 2009). Este defecto de liberación de Brn1 podría hacer que la hiper-condensación del nucléolo se mantuviese de forma más prolongada en el tiempo, incrementando los problemas de liberación de Cdc14 previamente descritos para el mutante *hit1Δ*.

En *S. cerevisiae*, la condensación del ADNr tiene lugar una vez que la transcripción del

ARNr se reduce significativamente durante las primeras etapas de anafase mediante la inhibición de Pol I, un proceso que es dependiente de Cdc14 (Clemente-Blanco et al., 2009). Cuando se reprime la transcripción por la ARN Pol I, se incrementa la unión de subunidades condensinas al ADNr, siendo la ocupación de estas subunidades en el ADNr inversamente proporcional al nivel transcripcional de dicha polimerasa (Wang et al., 2006). La hiper-condensación nucleolar observada en células *hit1Δ* podría deberse, por tanto, al hecho de que los defectos de ensamblaje de snoRNP y/o maduración del ARNr interfieran con la transcripción mediada por Pol I, afectando al procesamiento y modificación del pre-ARNr y, en última instancia, al proceso de condensación del ADNr. Otra posibilidad, no excluyente a la anterior, es que las snoRNPs puedan reclutar específicamente factores de descondensación en el ADNr. Precisamente, en células de *Drosophila*, el análisis de los ARNs asociados a cromatina (caARNs) indica un enriquecimiento elevado de moléculas de snoARN que se unen a la cromatina y reclutan al factor de descondensación Df31 en dominios específicos, manteniendo estas regiones en un estado abierto y accesible, es decir, descondensado (Schubert et al., 2012). Este enriquecimiento también se ha observado en células humanas, lo que sugiere que el proceso está conservado evolutivamente. Nuestros resultados, en cualquier caso, proporcionan un conjunto de evidencias que apoyan que los snoARNs y las proteínas asociadas a ellos juegan un papel esencial en la modulación y accesibilidad a regiones de la cromatina, así como en el establecimiento de una arquitectura nuclear y nucleolar adecuada en eucariotas.

4.3. La condensación tardía del ADNr permite la liberación eficiente de Cdc14:

Problemas con la liberación de Cdc14 mediada por FEAR durante los estadios iniciales de anafase generan defectos en la condensación del ADNr y la segregación nucleolar (Sullivan et al., 2004). Nuestros resultados demuestran ahora que, del mismo modo, una condensación prematura del ADNr dificulta la función de FEAR, impidiendo la liberación eficiente de Cdc14 durante las primeras etapas de anafase. En base a estas observaciones, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral nos permiten proponer una explicación a una cuestión hasta el momento abierta en el campo de la segregación cromosómica: ¿Por qué, en levaduras de gemación, el locus del ADNr no se condensa completamente hasta etapas finales de anafase, más tarde que otras regiones del ADN, y después de que se haya producido la eliminación de los complejos de cohesinas?

La segregación del ADNr en *S. cerevisiae* está espacialmente separada y

temporalmente retrasada de la del resto del genoma (Torres-Rosell et al., 2004). Así, el nucléolo segrega durante las últimas etapas de anafase, justo antes de producirse la citocinesis (D'Amours et al., 2004), y su distribución comprende dos etapas temporalmente separadas. La primera abarca la resolución del locus del ADNr desde su región más próxima al centrómero hacia la región más distal del mismo (Machin et al., 2005), mientras que la segunda etapa implica la compactación del ADNr, en un proceso que depende de Cdc14 (Machin et al., 2005). Pese a que se han propuesto distintas hipótesis para explicar por qué el locus del ADNr se compacta de forma tardía, manteniéndose las uniones independientes de cohesinas en el ADNr hasta el comienzo de anafase, hasta el momento no se había podido proponer una explicación satisfactoria a esta observación. Nuestros resultados proporcionan ahora una respuesta definitiva a esta incógnita. El nucléolo de la levadura de gemación se utiliza como un lugar donde confinar a Cdc14, la proteína que desencadena la inactivación de CDK y, por tanto, promueve la salida de mitosis (Stegmeier and Amon, 2004). La actividad de Cdc14 se regula principalmente en base a su localización subcelular, de manera que el control preciso de su liberación desde el nucléolo es de suma importancia para las células, ya que esta fosfatasa se requiere para coordinar temporalmente eventos claves del ciclo celular (Bloom et al., 2011; Rock and Amon, 2009; Stegmeier and Amon, 2004). De este modo, un control estricto de la localización de Cdc14 es esencial tanto para que se lleve a cabo de forma correcta la segregación cromosómica como para que se produzca la salida de mitosis (D'Amours et al., 2004). Por otra parte, la condensación cromosómica es un proceso fundamental para asegurar la propia segregación del genoma, pues la compactación del ADN imparte la rigidez estructural necesaria para que las cromátidas hermanas puedan ser trasladadas a polos opuestos de la célula (St-Pierre et al., 2009), así como para facilitar, con ello, la eliminación de catenaciones entre las cromátidas hermanas durante su distribución (Cuylen and Haering, 2011; St-Pierre et al., 2009; Thadani and Uhlmann, 2015). Por tanto, la condensación de los cromosomas debe promoverse activamente antes de que se produzca la eliminación de las cohesinas y de que las cromátidas hermanas se separen y segreguen hacia polos opuestos del huso mitótico. Sin embargo, y como demuestran nuestros resultados, la condensación prematura del ADNr supone un problema para la propia liberación de Cdc14. Nuestros análisis, por tanto, apoyan la idea de que la condensación tardía del ADNr en levaduras de gemación es necesaria para garantizar una eficiente liberación temprana de Cdc14 y para poder coordinar, de este modo, la señalización de salida de mitosis con la segregación nucleolar. La fosfatasa Cdc14 es necesaria para resolver las cromátidas hermanas y mantener la compactación adecuada del ADNr, de forma que sólo una vez que su actividad es promovida por la ruta FEAR, las células inician la compactación del

ADNr, asegurando así que la segregación de esta región cromosómica no afecte la señalización de salida de mitosis.

4.4. La función de Hit1 está conservada evolutivamente:

El proteoma nucleolar está, en gran parte, conservado a lo largo de la evolución. Así, se estima que el 90% de las proteínas humanas presentes en el nucléolo tienen claros homólogos en levaduras (Andersen et al., 2002; Boisvert et al., 2007). En concreto, la proteína nucleolar Hit1 de *S. cerevisiae* muestra homología con la proteína nucleolar humana ZNHIT3, también conocida como TRIP3 (del inglés *Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein3*). Al igual que Hit1 estabiliza a Rsa1, ZNHIT3 es necesaria para mantener los niveles adecuados de NUFIP, el homólogo funcional de Rsa1 en humanos (Bizarro et al., 2015; Rothe et al., 2014). Por otro lado, y de forma interesante, en células humanas se ha demostrado que NUFIP interacciona con p55 y p50, los homólogos de las proteínas del complejo chaperona de levaduras Rvb1 y Rvb2, facilitando así el reclutamiento de estas proteínas hacia los pre-snoRNPs, donde todas cooperan para conformar el andamio sobre el que se ensamblan, posteriormente, las snoRNPs C/D (Boulon et al., 2008; McKeegan et al., 2009). Esto sugiere que los mecanismos por los cuales se generan estas snoRNPs están conservados a lo largo de la evolución.

La fosfatasa Cdc14 también está conservada en células humanas, en las que se expresan dos ortólogos de esta proteína: CDC14A y CDC14B (Mocciaro and Schiebel, 2010). Aunque actualmente hay controversia sobre el papel de CDC14B, y sobre si realmente podría ser un homólogo funcional de Cdc14, la localización de CDC14B en humanos se asemeja mucho a la localización de Cdc14 en levaduras. CDC14B se encuentra principalmente en el nucléolo en interfase, para dispersarse por toda la célula al comienzo de mitosis (Mailand et al., 2002; Mocciaro and Schiebel, 2010). Además, en respuesta a estrés genotóxico CDC14B se relocaliza de nuevo en el nucléolo en G2, lo cual sugiere que podría ser importante para la activación eficiente de Chk1, quinasa que activa el punto de control de daños en el ADN (Bassermann et al., 2008). A la luz de nuestros resultados, y pese a que no está claro que el papel de Cdc14 promoviendo la salida de mitosis esté conservado evolutivamente en humanos, sería interesante analizar si la localización nucleolar de CDC14B se ve afectada en células humanas por la deficiencia de ZNHIT3. En este sentido, es importante señalar que la identificación de nuevas proteínas que participen en la regulación de la actividad y/o localización de CDC14B será de gran ayuda para clarificar el papel de esta fosfatasa en células

humanas.

En *H. sapiens*, ZNHIT3 promueve la biogénesis de snoRNPs C/D y la síntesis de ribosomas (Rothe et al., 2014), así como el procesamiento mediante “*splicing*” de los pre-ARNm (Hoskins and Moore, 2012; van der Feltz et al., 2012; Wahl et al., 2009). Por otro lado, ZNHIT3 actúa como un co-activador de varios factores transcripcionales, y la desregulación de sus niveles celulares promueve la proliferación de células tumorales (Brito et al., 2008), aunque se desconoce si esta propiedad se debe a la capacidad de ZNHIT3 de promover la biogénesis de snoRNPs C/D y la síntesis de ribosomas, o si proviene de su capacidad de controlar el crecimiento celular (Rothe et al., 2014). Finalmente, también se ha sugerido que ZNHIT3, además de estabilizar a NUFIP, posee funciones adicionales no relacionadas con las anteriores (Bizarro et al., 2015; Rothe et al., 2014), ya que se ha observado, por ejemplo, que la pérdida específica de la interacción entre ZNHIT3 y PRP31 provoca retinitis pigmentosa (Deery et al., 2002; Huranova et al., 2009; Vithana et al., 2001). De este modo, y basándonos en los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral, sería interesante analizar las consecuencias de la ausencia de factores de ensamblaje de snoRNPs, como ZNHIT3 o NUFIP, sobre la progresión del ciclo celular en líneas celulares humanas, y, especialmente, en el posible impacto que tenga sobre los procesos de salida de mitosis y segregación cromosómica. Estos estudios serán de gran utilidad para entender los mecanismos moleculares por los que la desregulación de los niveles de expresión de estos factores contribuye al desarrollo de tumores. En esta misma línea, sería interesante estudiar si en células humanas, como ocurre en células de levaduras, la ausencia de ZNHIT3 provoca una hiper-condensación nucleolar que pudiese estar detrás de algunos de los problemas asociados a un defecto en este factor de ensamblaje de snoRNPs.

Los datos recogidos en esta Tesis Doctoral contribuyen a esclarecer los efectos que las modificaciones en la estructura del nucléolo determinan sobre la correcta regulación de la segregación cromosómica y la salida de mitosis, y esperamos que puedan servir de base a nuevos estudios sobre procesos cuya alteración podría contribuir al desarrollo tanto de tumores como de otras enfermedades (ribosomales, etc.) en humanos. Un conocimiento más detallado sobre los mecanismos moleculares que conducen a estas enfermedades es esencial para poder, en un futuro, encontrar posibles terapias a las mismas. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos conseguido demostrar que, en *S. cerevisiae*, la ausencia de un solo factor involucrado en el ensamblaje de un tipo específico de snoRNPs provoca defectos generales durante la progresión del ciclo celular, que son especialmente evidenciables durante anafase. Nuestros datos

establecen que, en gran medida, estos defectos se deben a que existe una conexión, que podría estar conservada evolutivamente, entre factores de ensamblaje de ribosomas y la correcta regulación de salida de mitosis. De forma adicional, nuestros resultados proporcionan una explicación a la segregación tardía del ADN_r observada en *S. cerevisiae* y, en resumen, destacan la importancia de una correcta coordinación entre procesos celulares tan diferentes como la biogénesis de ribosomas, la segregación nucleolar y la salida de mitosis.

5. CONCLUSIONES:

1.- En *Saccharomyces cerevisiae*, el heterodímero Hit1-Rsa1 forma parte de un factor de ensamblaje de snoRNPs C/D cuya expresión es necesaria para la correcta progresión del ciclo celular.

2.- La falta de expresión de Hit1 dificulta la liberación mediada por la ruta FEAR de la fosfatasa Cdc14 desde el nucléolo durante las etapas iniciales de anafase, e interfiere con la función de Cdc14 en la regulación de eventos clave para el normal desarrollo de los procesos de segregación cromosómica y salida de mitosis.

3.- Los problemas con la liberación inicial de Cdc14 mediada por la ruta FEAR determinan que el mutante *hit1Δ* sea muy dependiente de la funcionalidad de la ruta MEN, y más concretamente de la función activadora de Lte1, para poder promover la salida de mitosis, lo cual explica la letalidad sintética asociada a la deficiencia simultánea de Hit1 y Lte1.

4.- La ausencia de Hit1 provoca una hiper-condensación prematura del ADNr en células de *S. cerevisiae*, como consecuencia de una mayor carga de complejos condensina en esta región del genoma. Dicha hiper-condensación del ADNr, a su vez, determina una estructura más compacta del nucléolo, que dificulta la liberación de Cdc14 desde este compartimento celular en el mutante *hit1Δ*.

5.- La condensación tardía del ADNr permite la correcta coordinación entre la segregación del nucléolo y la señalización de salida de mitosis. Puesto que una compactación prematura del nucléolo interfiere con la liberación de Cdc14, al producirse la condensación del ADNr de forma dependiente de la actividad de esta fosfatasa, las células se garantizan de que la compactación del nucléolo sólo pueda iniciarse una vez que la función de Cdc14 sea promovida por la ruta FEAR, impidiendo así que la segregación de esta región cromosómica afecte la señalización de salida de mitosis.

6. MATERIALES Y MÉTODOS:

6.1. ORGANISMOS MODELO:

6.1.1. Estirpes de *Escherichia coli*:

Las cepas bacterianas usadas en esta Tesis Doctoral derivan de *E. Coli* DH5- α (*f-endA1 gyrA96 hsdR17 Δ lacU169 f80lacZ Δ M15 recA1 relA1 supE44 thi-1*).

6.1.2. Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*:

Todas las estirpes de levaduras empleadas en esta Tesis derivan del fondo genético W303 (*ade2-1 can1-100, his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*), y sus genotipos se detallan en la Tabla 1.

6.2. REACTIVOS:

6.2.1. Antibióticos:

- **Ampicilina (Amp, Sigma):** antibiótico β -lactámico que impide la síntesis de la pared celular de las bacterias *E. coli* durante la división celular. Se utilizó a una concentración de 100 μ g/ml para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos con resistencia a este antibiótico.
- **Geneticina (G418, Phytotechnology Laboratories):** antibiótico aminoglicosídico inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó a una concentración de 250 μ g/ml para seleccionar cepas de *S. cerevisiae* resistentes a este antibiótico.
- **Kanamicina (Kan, Sigma):** antibiótico aminoglicosídico inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó a una concentración de 25 μ g/ml para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos con resistencia a este antibiótico.
- **Nourseotricina (clonNAT, Werner BioAgents):** antibiótico aminoglucosídico procedente de *Streptomyces noursei*. Se usó a una concentración de 100 μ g/ml para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* portadoras de un gen que confiere resistencia a nourseotricina.

6.2.2. Drogas e inhibidores:

- **Cóctel completo de inhibidores de proteasas (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche):** mezcla compuesta por inhibidores de proteasas de serina (tripsina y quimiotripsinas), cisteína y un amplio rango de metaloproteasas.
- **Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma):** inhibidor de proteasas de serina (tripsina y quimiotripsinas) y cisteína.
- **Ditiotreitol (DTT, Sigma):** compuesto reductor de puentes disulfuro de proteínas que poseen grupos sulfhidrilos libres.
- **1-NA-PP1 (Santa Cruz Biotech):** análogo de ATP que se une al sitio activo de versiones modificadas de quinasas de serina y tirosina inhibiendo su actividad. Se usó a 10 μ M en medio líquido para inhibir la actividad de Cdc15-as1 (Bishop et al., 2000).
- **FOA (US Biological):** ácido 5-fluoroorótico. Compuesto tóxico para aquellas células capaces de realizar la ruta completa de biosíntesis del uracilo (Yano et al., 2005). Se usó en medio sólido a una concentración de 0,3 mg/ml.
- **Benomilo (Sigma):** droga desestabilizadora de microtúbulos, usada en medio sólido a una concentración de 20 μ g/ml.
- **Factor alfa (Sigma):** feromona secretada por las cepas de sexo *MAT α* de *S. cerevisiae* para que tenga lugar la conjugación. Se usó a una concentración final de 5 μ g/ml en medio líquido (a partir de una solución stock de 5 mg/ml en DMSO) para bloquear las células *MAT α* de levadura en fase G1.

6.2.3. Enzimas:

- **Polimerasas termoestables de ADN:** Se usaron las siguientes ADN polimerasas:
 - Go-Taq Flexi (Promega): ADN polimerasa usada para realizar PCRs de comprobación.
 - Mytaq (Bioline): ADN polimerasa usada para realizar PCRs de comprobación.
 - Velocity (Bioline): ADN polimerasa de rápida amplificación, alta fidelidad y procesividad, capaz de amplificar fragmentos de más de 5 kb. Debido a sus características, se usó, principalmente, para la amplificación de fragmentos de ADN y su posterior clonación en plásmidos. De forma puntual, esta ADN

polimerasa también se usó para realizar PCRs de comprobación de fragmentos de ADN de gran tamaño.

- **ExTaq (Takara):** ADN polimerasa de alta fidelidad y procesividad, capaz de amplificar fragmentos incluso de 20 kb. Así pues, se usó, principalmente, para la obtención de fragmentos lineales de ADN y su posterior integración en el ADN genómico de la levadura.
- **Enzimas de restricción (Takara/NEB):** endonucleasas de ADN de doble cadena específicas de secuencia.
- **Ligasa de ADN del fago T4 (Roche):** enzima encargada de catalizar la unión covalente de extremos lineales de ADN bicatenario.
- **Zimoliasa 20T y 100T (US Biological):** mezcla de enzimas de *Artrobacter luteus* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*. La zimoliasa 20T tiene una actividad lítica de 20000 U/g, mientras que la zimoliasa 100T posee una actividad de 100000 U/g. Ambas se preparaban a una concentración de 10 mg/ml en sorbitol 1 M.
- **Glusolasa (Perkin Elmer):** mezcla de enzimas de *Helix pomatia* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.
- **RNAasa A (Roche):** endorribonucleasa específica de pirimidina que actúa sobre el ARN de cadena sencilla.
- **Fosfatasa alcalina de ADN (Roche):** glicoproteína dimérica de intestino bovino empleada para eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5' del ADN bicatenario.

6.2.4. Tampones y soluciones:

- **Tampón TE:** Tris-Clorhídrico 50 mM (pH 7,5) y EDTA 1 mM (pH 8).
- **Tampón TAE:** Tris-Acetato 0,04 M y EDTA 1 mM (pH 8).
- **Tampón de rotura de ADN:** para 1 litro de solución, se añadieron 2 ml Tritón X, 5 ml SDS 20% (p/v), 2 ml NaCl 5 M, 1 ml Tris 1 M (pH 8), 200 µl EDTA 0,5 M y 90 ml H₂O MiliQ. Por último, se autoclavó la solución final.
- **Tampón K₂HPO₄ 1M:** se disolvieron 174,18 g de K₂HPO₄ en un litro de H₂O MiliQ.
- **Tampón KH₂PO₄ 1M:** se disolvieron 136,09 g de K₂HPO₄ en un litro de H₂O MiliQ.
- **Tampón KPi 0,1M (pH 6,4):** se añadieron 27,8 ml de K₂HPO₄ 1 M a 72,2 ml de KH₂PO₄ 1 M, y se enrasó con H₂O MiliQ hasta 1 litro.

- **Tampón KPi 0,1M (pH 6,6):** se mezclaron 38,1 ml K_2HPO_4 1 M con 61,9 ml de KH_2PO_4 1 M, y se enrasó con H_2O MiliQ hasta 1 litro.
- **Tampón KPi 0,1M (pH 7,4):** se añadieron 80,2 ml K_2HPO_4 1 M a 19,8 ml de KH_2PO_4 1 M, y se enrasó con H_2O MiliQ hasta 1 litro.
- **Sorbitol-citrato 1,2M:** disolvimos 17,42 g de K_2HPO_4 , 7 g ácido cítrico y 218,64 g sorbitol en 1 l de H_2O MiliQ. Por último, se filtró la solución final.
- **PBS 10X:** NaCl 8,19% (p/v), KCl 0,2% (p/v), Na_2HPO_4 1,42% (p/v), KH_2PO_4 0,245% (p/v) en H_2O MiliQ. Finalmente, se autoclavó la solución.
- **PBS+T:** añadimos Tween-20 0,1% (v/v) en PBS1X.
- **TBS 10X:** constituido por NaCl 8% (p/v), KCl 0,2% (p/v), Tris Base 3% (p/v) (pH 7,4). Finalmente, se autoclavó la solución.
- **TBS-T:** compuesto por Tween-20 0,1% (v/v) en TBS1X.
- **PBS-BSA:** BSA 1% (p/v) en H_2O MiliQ, azida sódica 0,1% (p/v) en H_2O MiliQ, K_2HPO_4 0,04 M, KH_2PO_4 0,01 M y NaCl 0,15 M.
- **Tampón de rotura de proteínas:** a 966,25 μ l de tampón TE, se añadieron 2,75 μ l DTT 1 M, 11 μ l PMSF 100 mM y 20 μ l cóctel de inhibidores de proteasas.
- **Tampón 3X SDS:** se mezclaron 18,75 ml de Tris-Clorhídrico 0,5 M (pH 6,8); 3 ml de β -mercaptoetanol; 15 ml de glicerol; 4,5 g de SDS; 0,025 g de azul de bromofenol y se enrasó hasta 50 ml con H_2O MiliQ.
- **Ponceau S:** se disolvieron, en 300 ml de H_2O MiliQ, 1,4 g de Ponceau S; 9 g de TCA y 3 ml de ácido acético.
- **Tampón de electroforesis de proteínas 5X:** se solubilizaron 15 g de Tris Base, 72 g glicina y 25 ml de SDS 20% en H_2O MiliQ. Se enrasó la solución hasta 1 litro con H_2O MiliQ.
- **Tampón de transferencia 5X:** se disolvieron 15 g de Tris Base, 72 g de glicina y 5 ml de SDS 20% en H_2O MiliQ. Se enrasó hasta 1 litro con H_2O MiliQ.
- **Tampón PA:** Tris-Clorhídrico 50 mM y $MgCl_2$ 1 mM (pH 9).
- **Tampón de lisis (ChIP):** HEPES-KOH 50 mM (pH 7'5), NaCl 140 mM, EDTA 1mM (pH 8), Tritón X-100 1% y desoxicolato sódico 0'1%.
- **Tampón III (ChIP):** Tris-Clorhídrico 10 mM (pH 8); EDTA 1mM (pH 8); LiCl 250 mM; Igepal 0'5% y SDS 0'5%.
- **Solución de purificación (ChIP):** a 360 μ l de TE 1x se añadieron 35 μ l LiCl 5M y 10 μ l glicógeno (10 mg/ml).
- **Solución TER (ChIP):** a 980 μ l de TE se le añadieron 20 μ l de RNAsa R10.
- **Solución de digestión (IF):** 200 μ l de Sorbitol-Citrato 1,2 M se mezclaron con 20 μ l de glucosidasa y 2 μ l de zymoliasa 100T.

- **Medio de montaje con DAPI:** se mezclaron 100 mg p-phenyldiamine; 400 μ l K_2HPO_4 1 M; 100 μ l KH_2PO_4 1 M; 1,5 ml NaCl 1 M; 90 ml glicerol y 500 μ l de DAPI 10 μ g/ml. Ajustamos el pH a 8 y enrasamos con H_2O MiliQ hasta 100 ml.
- **Solución I miniprep:** Tris-Clorhídrico 25 mM, glucosa 50 mM y EDTA 10 mM (pH 8).
- **Solución II miniprep:** NaOH 200 mM y SDS 1%.
- **Solución III miniprep:** Para obtener 100 ml de solución, se mezclaron 25 g de KAc, ajustamos con ácido acético glacial hasta pH 4,8 y enrasamos con H_2O MiliQ hasta los 100 ml.

6.3. MEDIOS DE CULTIVO:

6.3.1. Medio de cultivo para bacterias:

- **Medio rico LB (Luria-Bertani):** extracto de levadura 0,5%, bacto-triptona 1% y NaCl 1%, en H_2O MiliQ. El medio sólido se preparaba añadiendo agar al 2%. Ambos medios se autoclavaban antes de ser utilizados.

6.3.2. Medios de cultivo para levaduras:

Para todos los medios de cultivo el solvente utilizado fue H_2O MiliQ, y los medios sólidos contenían un 2% de agar. La composición de cada medio era la siguiente:

- **Medio lavado YP:** extracto de levadura 1% (p/v) y bacto-peptona 2% (p/v).
- **Medio rico YPD:** extracto de levadura 1% (p/v), bacto-peptona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v) y adenina 0,02% (p/v).
- **Medio rico YPRaf:** extracto de levadura 1% (p/v), bacto-peptona 2% (p/v), rafinosa 2% (p/v) y adenina 0,02% (p/v).
- **Medio rico YPGal:** extracto de levadura 1% (p/v), bacto-peptona 2% (p/v), galactosa 2% (p/v) y adenina 0,02% (p/v).
- **Medio rico YPRaf-Gal:** extracto de levadura 1% (p/v), bacto-peptona 2% (p/v), rafinosa 2% (p/v), galactosa 2% (p/v) y adenina 0,02% (p/v).
- **Medio mínimo S:** YNB (bases nitrogenadas de levadura) 0,17% (p/v), sulfato amónico 0,5% (p/v) y Drop-out mix1 0,18% (p/v).

- Drop-out Mix1: mezclamos igual cantidad de alanina, arginina, asparragina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, inositol, isoleucina, fenilalanina, tirosina, valina y serina.
- **Medio mínimo SD:** YNB (bases nitrogenadas de levadura) 0,17% (p/v), sulfato amónico 0,5% (p/v), Drop-out mix1 0,18% (p/v) y glucosa 2% (p/v),
- **Medio mínimo SC:** medio SD suplementado con los aminoácidos triptófano 0,002% (p/v), histidina 0,002% (p/v), leucina 0,012% (p/v), metionina 0,002% (p/v), lisina 0,003% (p/v) y las bases nitrogenadas uracilo 0,002% (p/v) y adenina 0,002% (p/v).
- **Medio mínimo:** YNB (bases nitrogenadas de levadura) 0,67% (p/v), glucosa 2% (p/v), Drop-out Mix2 0,2% (p/v), suplementado con los aminoácidos triptófano, histidina y metionina al 1% (p/v); uracilo al 0,2% (p/v); y leucina al 2% (p/v).
 - Drop-out Mix2: añadimos en las mismas proporciones alanina, arginina, asparragina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, inositol, isoleucina, fenilalanina, tirosina, valina, serina, lisina, prolina, treonina y una cuarta parte menos de adenina.
- **Medio de esporulación SPO:** acetato potásico 1% (p/v), extracto de levadura 0,1% (p/v), glucosa 0,05% (p/v), los aminoácidos triptófano 0,008% (p/v), histidina 0,008% (p/v), leucina 0,048% (p/v), metionina 0,008% (p/v), lisina 0,012% (p/v) y las bases nitrogenadas uracilo 0,008% (p/v) y adenina 0,008% (p/v).

6.4. CONSERVACIÓN DE CEPAS Y ESTIRPES:

6.4.1. Conservación de cepas bacterianas:

Las cepas bacterianas se congelaron a -80°C en viales con glicerol al 20% a partir de un cultivo crecido en medio LB líquido. Cuando las cepas portaban un plásmido, el medio, además, se suplementaba con ampicilina o Kanamicina, según el caso.

6.4.2. Conservación de estirpes de levadura:

Las estirpes de levaduras se congelaron a -80°C en viales, a partir de biomasa crecida en placa y posteriormente resuspendida en glicerol al 20%.

6.5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS:

6.5.1. Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli* (miniprep):

Para la extracción de ADN plasmídico de bacterias se usó un método basado en la lisis alcalina. En concreto, se inoculaba una colonia de *E. coli* en 3 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, y se dejaba crecer durante toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente, el cultivo se recogía centrifugándolo 1 minuto a 13000 rpm, y las células se resuspendían en 100 µl de Solución I a 4°C. A continuación, se añadían 200 µl de Solución II (preparada en el momento) y se invertía el tubo varias veces para provocar la lisis celular. A continuación, se añadían 150 µl de Solución III, mezclando de nuevo por inversión suave. La reacción se dejaba incubarse en hielo durante 5 minutos, transcurridos los cuales se centrifugaba durante 15 minutos a 13000 rpm y 4°C. El sobrenadante se transfería a 1 ml de etanol absoluto (Emsure) a 4°C y se incubaba a -20°C durante, al menos, 2 horas para permitir así que el ADN precipitase. Pasado este tiempo, las muestras se volvían a centrifugar durante 15 minutos a 13000 rpm y 4°C, se retiraba el sobrenadante y se secaban los precipitados (o *pellets*) en una campana de extracción. Por último, estos precipitados se resuspendían en 30 µl de agua MiliQ y podían conservarse congelándolos a -20°C.

6.5.1.1. Plásmidos:

Los plásmidos utilizados en esta Tesis Doctoral se detallan en la Tabla 2. Para la clonación y propagación de fragmentos de ADN se utilizaron, de forma general, los plásmidos de la serie pRS, descritos en (Sikorski and Hieter, 1989). La amplificación de fragmentos de ADN para el etiquetado o delección de genes por recombinación homóloga se realizó usando los plásmidos descritos en (Longtine et al., 1998).

6.5.2. Extracción de ADN genómico de levadura:

Para la extracción de ADN genómico de levaduras se disolvía biomasa de la estirpe de interés en 500 µl de tampón TE, se centrifugaba durante 1 minuto a 13000 rpm, y el precipitado se resuspendía en 250 µl de tampón de rotura de ADN, junto con 250 µl de fenol-cloroformo (Sigma) y un volumen aproximadamente igual a 250 µl de bolas de

vidrio (Sigma). Las muestras se agitaban en un agitador tipo *vórtex* durante 10 minutos a 4°C y máxima velocidad y, posteriormente, se centrifugaban durante 15 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente, separándose así la fase acuosa de la fase fenólica. La fase acuosa se transfería a 1 ml de etanol absoluto (Emsure) y se incubaba a -20°C durante, al menos, 2 horas, con el fin de precipitar el ADN. Pasado este tiempo, las muestras se volvían a centrifugar durante 15 minutos a 13000 rpm y 4°C. Tras retirar el sobrenadante, el precipitado se secaba en una campana de extracción y, por último, se resuspendía en 30 µl de agua MiliQ, pudiendo conservarse a -20°C una vez disuelto.

6.6. OBTENCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS MEDIANTE TRANSFORMACIÓN:

Para la transformación de plásmidos en bacterias se añadían 10 µl del ADN de interés a 100 µl de bacterias quimio-competentes. Esta mezcla se mantenía en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las células se sometían a un choque térmico durante 45 segundos a 42°C, seguido de 5 minutos de incubación en hielo. A continuación, se añadía 1 ml de medio líquido LB y las células se incubaban durante 45 minutos a 37°C en rotación suave. Por último, se recogían las bacterias por centrifugación durante 5 minutos a 6000 rpm, y se sembraban en el medio selectivo correspondiente (normalmente, LB + ampicilina).

6.7. OBTENCIÓN DE ESTIRPES DE LEVADURAS:

6.7.1. Obtención de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* mediante cruces genéticos:

Para la generación de estirpes mediante cruces genéticos se co-cultivaban las estirpes parentales (haploides de sexo opuesto) en una placa durante 24 horas a temperatura permisiva. A continuación, se aislaban los diploides en un medio selectivo en función de los genotipos parentales, sembrándolos en forma de *zig-zag* y dejándolos crecer en la placa durante, al menos, 48 horas. Las colonias de diploides se cultivaban, en forma de parches, en otra placa durante 24 horas, con el fin de obtener una mayor cantidad de biomasa. Los diploides se replicaban, posteriormente, en una placa de esporulación

(SPO) y se dejaban crecer 48 horas para inducir la meiosis (Figura M1). La presencia de tétradas se comprobaba mediante microscopía óptica utilizando un equipo Primo Star (Zeiss) con un objetivo de 40X. Las tétradas resultantes se trataban con 20 μ l de Zymoliasa 20T (5 μ g/ μ l) durante 7 minutos a temperatura ambiente, con el objetivo de digerir la pared celular. Esta reacción se detenía mediante la adición de 300 μ l de H₂O MiliQ. La disección de las esporas se llevaba a cabo en un micromanipulador Singer MSM-Series 300. El genotipo de las esporas se analizaba mediante réplicas en los diferentes medios selectivos, y el sexo se determinaba según la capacidad de las esporas de formar diploides con cepas *MATa* o *MAT α* que portaban las mutaciones complementarias al fondo genético W303 (“*mating testers*”).

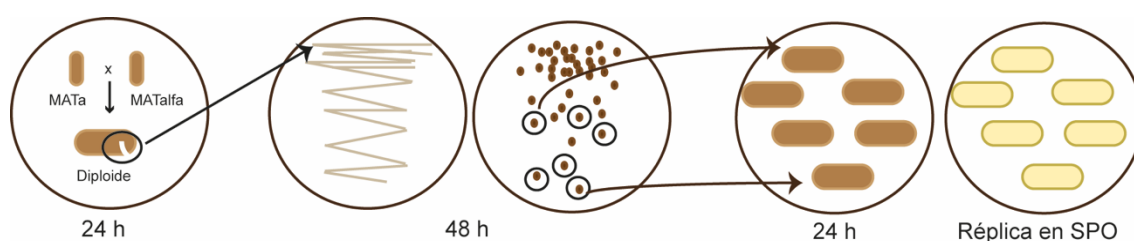


Figura M1: Obtención de tétradas de *S. cerevisiae*. Se co-cultivan las estirpes parentales durante 24 horas en una placa de Petri. Se aíslan los diploides sembrándolos en forma de *zig-zag* en otra placa durante, al menos, 48 horas. Las colonias provenientes de estos *zig-zags* se siembran en forma de parche en una placa nueva y se dejan crecer durante 24 horas. Estos parches se replican en una placa de medio de esporulación (SPO) y se dejan en la placa, como mínimo, 48 horas. Transcurrido este tiempo, debe haberse inducido la meiosis y es posible observar las tétradas de *S. cerevisiae* utilizando un microscopio óptico.

6.7.2. Obtención de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* mediante transformación:

La transformación de plásmidos o fragmentos lineales de ADN en levaduras se realizó según el protocolo descrito en (Gietz and Woods, 2002). Específicamente, las células a transformar se crecían en medio líquido hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,4-0,8$. Las células de este cultivo se recogían por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y se lavaban con agua MiliQ y, posteriormente, con una solución de acetato de litio 0,1 M (Sigma). A continuación, las células se resuspendían en una solución compuesta por 240 μ l de PEG al 50%; 36 μ l de acetato de litio 1 M; 10 μ l de espermatozoides de salmón (2 mg/ml); 8 μ l de ADN y 66 μ l de H₂O por cada reacción de transformación. La mezcla se incubaba durante 30 minutos a 30°C en rotación, tras lo cual se sometía a un choque

térmico de 42°C durante 15 minutos. Por último, las células se centrifugaban durante 2 minutos a 3000 rpm y se sembraban en los medios selectivos correspondientes. En el caso de que tras la transformación las células adquiriesen resistencia a antibióticos o drogas, primero se sembraban en medio rico y, al día siguiente, se replicaban en el medio selectivo correspondiente.

6.7.2.1. Deleción y etiquetado de genes de levaduras:

Para la obtención de estirpes con genes delecionados, etiquetados o bajo la expresión de un promotor distinto al endógeno, nos basamos en el método descrito en (Longtine et al., 1998). Sólo para el etiquetado de proteínas con eGFP se usó el método descrito en (Sheff and Thorn, 2004). Ambos métodos se basan en la amplificación de un fragmento de ADN que contiene el epítipo específico y/o el marcador de selección, y al que le añadimos extremos de homología con nuestro gen de interés. Posteriormente, este fragmento se integraba, mediante recombinación homóloga, en el ADN genómico. Para las deleciones, se diseñaron cebadores que contenían nucleótidos con secuencias homólogas a los 50 nucleótidos previos al codón de inicio de nuestro gen de interés (cebador directo) y a los 50 nucleótidos inmediatamente posteriores al codón de terminación (cebador inverso). Por otro lado, para el etiquetado de genes, se usaba la misma estrategia, pero las regiones específicas en los cebadores variaban correspondientemente en función de si se pretendía marcar el gen en el extremo C-terminal o N-terminal. Finalmente, también se procedía del mismo modo cuando se pretendía reemplazar el promotor del gen, seleccionando en este caso regiones específicas de homología que flanquean el promotor endógeno a sustituir. Las reacciones de amplificación se purificaban con el Kit comercial (Gen Eluate PCR Clean, Sigma) y se transformaban en levaduras. La comprobación de la deleción o marcaje de un gen se realizaba mediante PCR convencional, usando cebadores externos a la zona reemplazada o etiquetada. Adicionalmente, el marcaje de genes también se comprobaba mediante análisis Western y, cuando era posible, mediante visualización directa por microscopía.

6.7.2.2. Electroforesis de ADN:

La electroforesis es una técnica que separa los fragmentos de ADN según su movilidad en un campo eléctrico. Gracias a esta técnica podemos identificar fragmentos de ADN. Se usaron, de forma general, geles de agarosa al 1% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio

(BrEt, Sigma), en los que las muestras de ADN se sometían a un campo eléctrico constante de 5 V/cm en tampón TE. Para la comparación de los tamaños de los fragmentos de ADN se usaba el marcador 1Kb Plus (Invitrogen).

6.8. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR EN LEVADURAS:

Los ensayos de viabilidad celular, o test de gotas, se llevaron a cabo creciendo las células de *S. cerevisiae* durante toda la noche en el medio de cultivo correspondiente y a temperatura permisiva para todas las estirpes del estudio. A continuación, los cultivos se diluían a $DO_{600nm} = 0,2$ y se dejaban crecer. Una vez los cultivos alcanzaban la fase exponencial, se diluían de nuevo hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,3$ (o 0,5 para los cultivos que iban a crecerse en placas de medio mínimo). A partir de esta última dilución, se realizaban cuatro diluciones seriadas 1/10. Por último, se sembraban 5 μ l de las diluciones seriadas en placas de medio rico (u 8 μ l si se sembraban en placas de medio mínimo), y se incubaban a la temperatura adecuada.

6.9. SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS EN LEVADURAS:

Para los experimentos de sincronización de cepas *MATa* en fase G1 de *S. cerevisiae*, se inoculaban las estirpes en medio líquido la tarde anterior al experimento y se dejaban crecer a temperatura permisiva y en agitación durante la noche. A la mañana siguiente, los cultivos se diluían a $DO_{600nm} = 0,2$, tras lo cual se añadía a los mismos la feromona factor- α (Sigma) disuelta en DMSO (Sigma) a una concentración final de 5 μ g/ml. Los cultivos se incubaban en agitación durante 75 minutos y se volvía a añadir factor- α , esta vez, a una concentración de 2,5 μ g/ml. Una vez que verificábamos, mediante microscopía óptica, que las células estaban bloqueadas en G1, se procedía a la liberación del cultivo (normalmente entre 150 y 210 minutos tras iniciar el arresto). Para ello, se usaba un sistema de vacío consistente en un matraz kitasato acoplado a un filtro sobre el que se colocaba una membrana con tamaño de poro de 0,8 μ m (Pall Corporation), de forma que cuando se pasaba el cultivo por el sistema de vacío, las células quedasen retenidas en la membrana. Posteriormente, se lavaba la membrana con diez volúmenes de medio libre de feromona para eliminar los restos de factor- α . Finalmente, se introducía la membrana (con las células retenidas) en un matraz con

medio líquido nuevo y sin feromona, permitiendo, de este modo, la entrada sincrónica de las células en el ciclo celular. Tras la liberación, como norma general, se tomaban secuencialmente muestras de cultivo cada 15 minutos durante un total de 180 minutos (es decir, se tomaban normalmente 12 muestras o puntos).

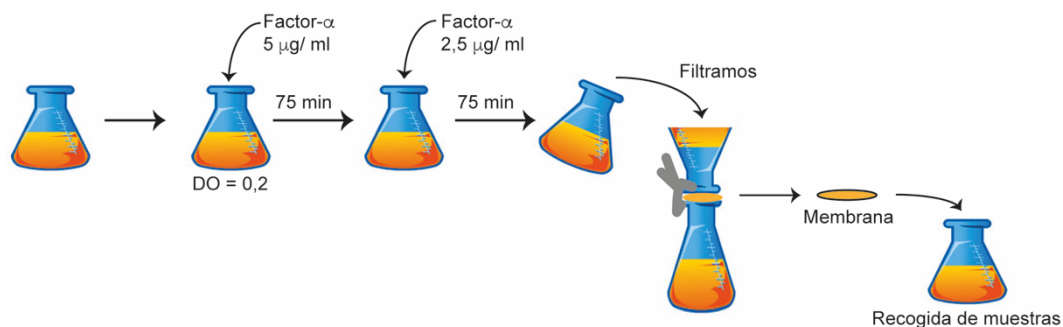


Figura M2: Sincronización de cultivos de *S. cerevisiae*. Los cultivos se diluyen a $D.O_{600nm} = 0,2$, tras lo cual se añade factor- α a una concentración de $5 \mu\text{g/ml}$. Transcurridos 75 minutos, se vuelve a añadir factor- α a una concentración de $2,5 \mu\text{g/ml}$. Una vez verificado que las células están bloqueadas en G1, se filtra el cultivo quedándose las células retenidas en una membrana, la cual se introduce en un matraz nuevo con medio de cultivo fresco y libre de feromona, para que estas células puedan entrar de forma sincrónica en el ciclo celular. A partir de este momento, recogemos las muestras correspondientes para llevar a cabo el análisis posterior.

6.10. ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR MEDIANTE ANÁLISIS DE GEMACIÓN:

Para el análisis de la gemación, se tomaba 1 ml de cultivo de *S. cerevisiae*, y las células se fijaban en formaldehído al 3,7% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las células se lavaban dos veces con KPi 0,1 M (pH = 6,4) y se resuspendían finalmente en 250 µl de KPi 0,1 M (pH = 6,4). En el momento de ser analizadas, las muestras se sonicaban previamente durante 3 segundos a amplitud 10% (Sonicador Branson). Finalmente, las células se visualizaban en un microscopio óptico Primo Star (Zeiss) con un objetivo de 40X.

Análisis de Gemación

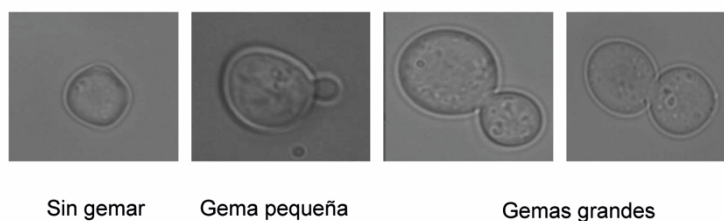


Figura M3: Categorías celulares según el tamaño de la gema en *S. cerevisiae*. Se muestran imágenes representativas de cada categoría contemplada en los análisis de gemación realizados. De izquierda a derecha, se muestran imágenes de microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) de una célula sin gemar, una célula con gema pequeña y dos células con gemas grandes.

6.11. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA:

6.11.1. Análisis de la localización de proteínas fluorescentes en *S. cerevisiae*:

La preparación de células para visualizar proteínas etiquetadas con GFP, eGFP, yEGFP o mCherry al microscopio de fluorescencia se realizó según el protocolo descrito en (Monje-Casas and Amon, 2009). En resumen, las células se recogían centrifugándolas 1 minuto a 13000 rpm, y se fijaban en formaldehído al 2,5% en tampón KPi 0,1 M (pH 6,4) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaban dos veces con tampón KPi 0,1 M (pH 6,6) y se resuspendían en 1 ml de tampón KPi 0,1 M (pH 7,4). Cuando se quería también visualizar la morfología nuclear, las células se centrifugaban, adicionalmente, durante 1 minuto a 13000 rpm y se resuspendían en 1 ml de etanol al 80% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las células se centrifugaban de nuevo para eliminar los restos de etanol y se resuspendían en 70 μ l de DAPI (1 mg/ml). Las muestras se analizaban usando un microscopio de fluorescencia DM6000 (Leica) equipado con el objetivo de inmersión 100x/1.40, filtros A4, L5 y TX2 y una cámara digital DF350 CDD (Leica). Las imágenes de microscopía de fluorescencia se procesaban usando los programas LAS AF (Leica) e ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

5.11.2. Inmunofluorescencia (IF) para la visualización de proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*:

Para la inmunolocalización de proteínas en levaduras se siguió el protocolo descrito en (Visintin et al., 1999). En resumen, se recogían las células de 1 ml de cultivo en fase exponencial por centrifugación y se fijaban con 1 ml de formaldehído al 3,7% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) durante toda la noche a 4°C. En el caso de la detección conjunta de tubulina y otras proteínas marcadas con epítopos específicos (por ejemplo, 3HA o 13Myc), la fijación se realizaba a temperatura ambiente durante un tiempo variable (entre 10 minutos y 1 hora, según la proteína de interés). Tras la fijación, las células se lavaban dos veces con tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) y se resuspendían en 222 µl de solución de digestión (hecha en el momento y mantenida en hielo). A continuación, las células se digerían a 30°C en una noria rotatoria. El tiempo empleado en la digestión de las células dependía de la proteína a visualizar (por ejemplo, para el caso de la tubulina, era de 20 minutos). Tras la digestión, las células se centrifugaban durante 2 minutos a 3000 rpm, se lavaban dos veces con sorbitol-citrato 1,2 M y se resuspendían en esta solución con un volumen que dependía del tamaño del *pellet* (idealmente, se añadía sorbitol-citrato 1,2 M hasta conseguir una dilución de $DO_{600nm}=0,4$ en todas las muestras). Posteriormente, se añadían 5 µl de la solución de células a cada pocillo de un portaobjetos multipocillo (Thermo Scientific Menzel-Glaser Diagnostika) previamente tratado con poli-lisina al 0,1% (Sigma). Tras 10 minutos de incubación, se retiraba el exceso de células de los pocillos mediante succión con una bomba de vacío, y se fijaban las células restantes al portaobjetos sumergiéndolo en metanol (WWR) a -20°C durante 3 minutos y, seguidamente, durante otros 10 segundos en acetona (Merk), también a -20°C. Posteriormente, se añadían a cada pocillo 5 µl del anticuerpo primario diluido en PBS-BSA a la concentración correspondiente (ver Tabla 3), y se incubaba el portaobjetos en una cámara húmeda (un recipiente cerrado con un trozo de papel embebido en agua para mantener la humedad, sobre el que se colocaba el portaobjetos) a temperatura ambiente durante 2 horas en oscuridad. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaban 5 veces con PBS-BSA, y se añadían 5 µl/pocillo de anticuerpo secundario diluido en PBS-BSA a la concentración correspondiente (ver Tabla 3), incubándose nuevamente el portaobjetos con las muestras 2 horas en una cámara húmeda y en oscuridad. Tras esta incubación, se volvían a lavar los pocillos 5 veces con PBS-BSA y, finalmente, se añadía medio de montaje con DAPI, se sellaba el cubreobjetos con laca de uñas y, si era necesario, se almacenaba la inmunofluorescencia a -20°C hasta la visualización de las muestras.

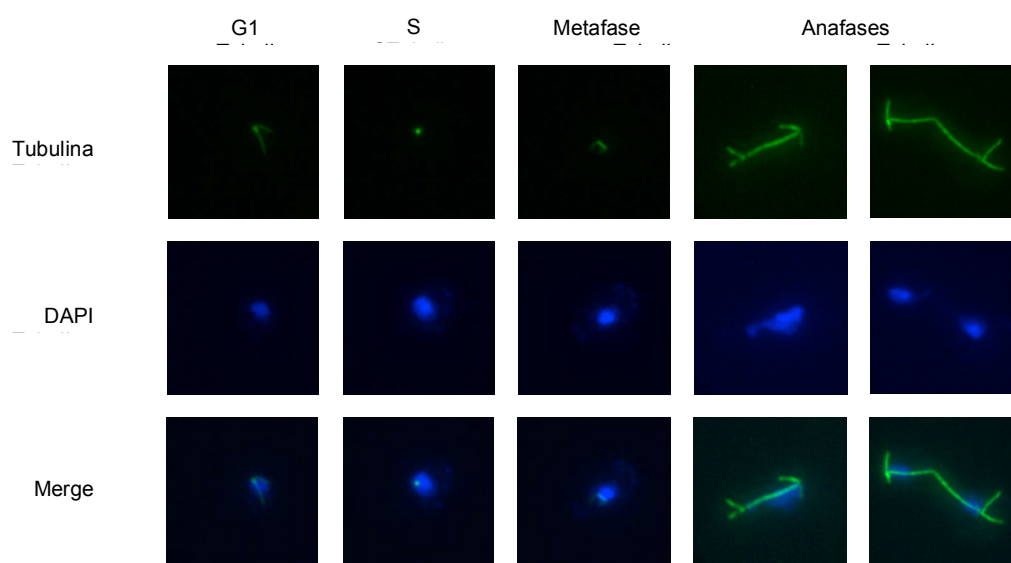


Figura M4: Etapas del ciclo celular según la morfología nuclear y la tubulina en *S. cerevisiae*.

Se muestran imágenes representativas de células del tipo silvestre (F496) en distintas fases del ciclo celular obtenidas mediante inmunofluorescencia. Puede observarse el huso (tubulina, en verde), el núcleo (DAPI, en azul), y una imagen resultado de la superposición de las anteriores (Merge). De izquierda a derecha, se muestra una célula en fase G1, una célula en fase S, una célula en metafase y dos células en anafase.

6.11.2.1. Preparación de esferoplastos:

Para la preparación de esferoplastos de levaduras se cultivaban 100 ml de células de la estirpe silvestre, se diluía el cultivo a $DO_{600nm} = 0,2$ y se dejaba crecer hasta alcanzar la fase exponencial. A continuación, las células se recogían mediante centrifugación durante 5 minutos a 3000 rpm y se resuspendían en 50 ml de formaldehído al 3,7% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4). Posteriormente, las células se fijaban durante toda la noche a 4°C en agitación y, seguidamente, se lavaban 3 veces con 50 ml de tampón KPi 0,1M (pH = 6,4), resuspendiéndolas en 10 ml de sorbitol-citrato 1,2 M. A la suspensión de células se añadían 100 μ l de zymoliasa 100T (10 mg/ml, US Biological) y 1 ml de glucolasa (PerkinElmer) para romper la pared celular. Las células se digerían rotándolas en una noria durante 1 hora a 30°C. Para comprobar que la digestión se había realizado correctamente, 3 μ l de la muestra se mezclaban con 3 μ l de SDS al 1%. La aparición de células lisadas, al observarlas al microscopio óptico, indicaba que la digestión de la pared celular durante la incubación se había realizado con éxito. Para detener la digestión, las células se lavaban con 50 ml de sorbitol-citrato 1,2 M y se recogían mediante centrifugación durante 5 minutos a 1000 rpm. Por último, las células

se resuspendían en 5 ml de sorbitol-citrato 1,2 M, se repartían en alícuotas de 1ml, y se conservaban a -20°C.

6.11.2.2. Preparación de anticuerpos para inmunofluorescencia:

Los anticuerpos anti-HA, anti-ratón-Cy3 y anti-rata-FITC, a diferencia de lo que ocurre con el anticuerpo anti-tubulina, no reconocen proteínas endógenas de levaduras. Por este motivo, los citados anticuerpos pueden someterse a un tratamiento de pre-absorción usando esferoplastos de levaduras, con el objetivo de eliminar posibles uniones inespecíficas y mejorar la calidad de la señal de inmunofluorescencia.

Para la pre-absorción de los anticuerpos, se mezclaban 100 µl del anticuerpo de interés con 100 µl de esferoplastos de levadura. La mezcla se incubaba, posteriormente, a temperatura ambiente durante 20 minutos en una noria en rotación, tras lo cual, se centrifugaba durante 2 minutos a 3500 rpm y 4°C. El sobrenadante se transfería a otro tubo, al que se volvían a añadir 100 µl de esferoplastos. Esta operación se repetía un total de cinco veces, de forma que el sobrenadante recogido tras la última centrifugación era el anticuerpo pre-absorbido diluido 6 veces respecto a la concentración original. Por último, se realizaban alícuotas del anticuerpo y se conservaban a -20°C.

6.12. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LEVADURAS:

6.12.1. Extracción de proteínas de *S. cerevisiae* con ácido tricloroacético (TCA):

Este método se basa el protocolo descrito en (D'Aquino et al., 2005). En resumen, se centrifugaban 10 ml del cultivo de levaduras durante 5 minutos a 3000 rpm, se retiraba el sobrenadante y se resuspendía el precipitado en 10 ml de ácido tricloroacético (TCA, Sigma) al 5%, tras lo cual se incubaban las células durante 10 minutos a 4°C. La muestra se volvía a centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm y 4°C, se retiraba el sobrenadante, y el precipitado se resuspendía en 1 ml de acetona (Merk) usando un agitador tipo *vórtex*. Posteriormente, las muestras se centrifugaban durante 7 minutos a 13000 rpm y se retiraba el sobrenadante. El precipitado se dejaba secar en una campana de extracción, al menos, durante 90 minutos. Pasado este tiempo, el precipitado se resuspendía en 150 µl de tampón de rotura para proteínas, se añadía aproximadamente

el mismo volumen de bolas de vidrio (Sigma), y se agitaba la mezcla a 4°C en un homogeneizador de muestras (sistema Fast-Prep (Millipore-24), llevando a cabo cinco ciclos de 20 segundos a fuerza 5). Alternativamente, también podía emplearse un agitador *multivórtex* para homogeneizar las muestras, agitándolas durante 40 minutos a máxima velocidad. Posteriormente, a cada muestra se le añadía 75 µl de tampón 3xSDS, y la mezcla se incubaba durante 5 minutos a 100°C en un termobloque y se centrifugaba durante 5 minutos a 13000 rpm y 4°C. Por último, el sobrenadante se transfería a un tubo limpio para eliminar los posibles restos celulares en el extracto de proteínas. Las muestras podían almacenarse a -20°C.

6.12.2. Extracción de proteínas de *S. cerevisiae* con sosa (NaOH):

Este método está adaptado del descrito originariamente por (Horvath and Riezman, 1994). Las células de levadura se crecían hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 1$, tras lo cual, los cultivos se centrifugaban y las células se lavaban dos veces con agua MiliQ. A continuación, las células se resuspendían en 400 µl de NaOH 0,15 M y se incubaban durante 5 minutos en hielo, para permitir así la lisis celular. El lisado se centrifugaba 3 minutos a 6000 rpm y 4°C. Posteriormente, se añadían 150 µl de 2XSDS con 0,02 µg/µl de β-Mercaptoetanol (esta preparación debía hacerse en el momento). Las muestras se calentaban a 95°C durante 5 minutos en un termobloque y los lisados se centrifugaban a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras podían, finalmente, utilizarse directamente o almacenarse a -20°C.

6.12.3. Análisis Western (Western blot, WB):

Las proteínas de los extractos obtenidos de células de *S. cerevisiae* se separaron mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida 29:1, National Diagnostics). El porcentaje final de acrilamida empleado dependía del tamaño de la proteína de interés. La electroforesis se llevaba a cabo en el sistema Mini-protean (Biorad), el sistema Midi-Vertigel 2 (Apelex), o el sistema SE600 (Hoefer), según el número de muestras y la separación deseada, aplicando un voltaje de 200 V. Como marcador de peso molecular se usaba un patrón de tamaños preteñido (ProSieve Color Protein Marker, Lonza). Tras finalizar la electroforesis, las proteínas se transferían durante 2 horas a 400 mA desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, GE Healthcare), usando un sistema de transferencia húmeda (Amersham Biosciences). La eficiencia de la transferencia se comprobaba mediante la incubación de las

membranas con solución Ponceau S durante 5 minutos en agitación suave. Posteriormente, las membranas se bloqueaban con PBS-T o TBS-T (según el anticuerpo utilizado) y leche en polvo al 3% durante, al menos, una hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Una vez bloqueadas, las membranas se incubaban con el anticuerpo primario (disuelto en PBS o TBS) en agitación a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, las membranas se lavaban tres veces con PBS-T o TBS-T, según el anticuerpo, durante 15 minutos y, seguidamente, se incubaban con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente (Ver Tabla 4, que detalla los anticuerpos utilizados y las condiciones empleadas). Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaban, de nuevo, tres veces con PBS-T o TBS-T durante 15 minutos. Finalmente, se usaba el sistema de detección por quimioluminiscencia Western Bright ECL System (Advansta).

6.13. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP):

Para realizar los ensayos de inmuno-precipitación de cromatina se siguió el protocolo descrito en (Hecht et al., 1999), con las modificaciones que se recogen a continuación. Se crecían 50 ml de cultivo en medio rico a 26°C con agitación hasta que las células alcanzaban la fase exponencial. A continuación, las células se trataban con formaldehído al 1% durante 15 minutos y con agitación suave, para conseguir fijar las proteínas al ADN. Esta reacción se bloqueaba añadiendo glicina 125 mM durante 5 minutos. A continuación, las células se centrifugaban a 3000 rpm a 4°C durante 2 minutos, se lavaban dos veces con PBS a 4°C y se resuspendían en 300 µl de tampón de lisis, complementado con inhibidores de proteasas (Cóctel completo de inhibidores de proteasas, Roche). Las células se mezclaban con un volumen igual de bolas de vidrio, y se rompían en frío usando el homogeneizador de muestras Fast Prep-24 (MP Biological). Las bolas y la fracción no soluble se eliminaban mediante centrifugación, y el precipitado se resuspendía en 300 µl de tampón de lisis con inhibidores, y se sonicaba a 4°C durante 15 minutos (alternando pulsos de 30 segundos de intensidad y descanso) en un Bioruptor (Diagenode, Bélgica). Con este tratamiento, el ADN se fragmentaba en trozos de aproximadamente 300 pb. Posteriormente, las muestras se centrifugaban dos veces durante 5 y 15 minutos, respectivamente, a 4°C a máxima velocidad para eliminar los restos celulares. Del sobrenadante obtenido se apartaban 20 µl como control total (INPUT) y el resto se inmunoprecipitaba.

Para la inmuno-precipitación, la muestra se incubaba toda la noche a 4°C con 5 µl de

anticuerpo anti-V5 (Serotec), en agitación suave. Posteriormente, se añadían bolas de Proteína A-Sefarosa (GE-Healthcare) y la muestra se agitaba durante 2 horas bajo las mismas condiciones. Tras la incubación, las bolas se lavaban sucesivamente con tampón de lisis, con tampón de lisis suplementado con NaCl 500 mM, con tampón III y, por último, con TE. En todos los casos, los tampones contenían inhibidores de proteasas. A continuación, las bolas se eluían en 60 µl de TE con SDS 0,1%. Para separar el material biológico de las bolas de proteína A se incubaba el precipitado durante 10 minutos a 65°C y, seguidamente, se centrifugaba durante dos minutos a máxima velocidad. Tras este proceso, se tomaban 20 µl del sobrenadante como inmunoprecipitado.

Una vez realizada la inmuno-precipitación, se procedía al procesamiento de las muestras. Para ello, se añadían 20 µl de TE con SDS 0,1% y 1,2 µg de pronasa tanto a los 20 µl de INPUT, como a los del precipitado. Las muestras se incubaban durante 2h a 42°C y, posteriormente, durante 6h a 65°C, con el objetivo de revertir la fijación con formaldehído y eliminar las proteínas. Para purificar el ADN, las muestras se llevaban hasta un volumen total de 400 µl con solución de purificación y el mismo volumen de fenol-cloroformo, tras lo cual se centrifugaba 5 minutos a máxima velocidad. El sobrenadante obtenido se trataba con 400 µl de cloroformo. Posteriormente, las muestras se precipitaban toda la noche en etanol 96° a -20°C, se lavaban con etanol 70% y se resuspendían en TER durante 1 hora a 37°C. Finalmente, el ADN se eluía en 200 µl de TE y podía conservarse a -20°C.

6.13.1. Análisis de los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa (qPCR):

La cantidad de ADN tanto de los INPUTS como de los precipitados en los ensayos ChIP se determinó mediante PCR cuantitativa (7500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystems; 7500 System Software V1.4.0). Como reactivo para la qPCR se usaba iTaq Universal SYBR Green Supermix (BIO-RAD), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y empleando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 5.

El enriquecimiento de proteínas en cada región específica del genoma estudiada se calculó como la proporción entre la cantidad de ADN obtenida para el inmunoprecipitado y el INPUT en la estirpe etiquetada respecto a la misma proporción en una estirpe sin etiquetar (Teytelman et al., 2013).

6.14. TABLAS:

TABLA M1: ESTIRPES DE LEVADURAS UTILIZADAS:

Nombre	Genotipo
F350	MATa, <i>mad1::HIS3MX6</i>
F496	MATa (estirpe silvestre)
F527	MATa, <i>lte1::KanMX6, Ycp50-LTE1(URA3)</i>
F528	MAT α , <i>lte1::KanMX6, Ycp50-LTE1(URA3)</i>
F549	MATa, <i>lte1::KanMX6</i>
F651	MATa, <i>pRS316::URA3</i>
F901	MATa, <i>tab6-1</i>
F1288	MATa, <i>hit1::TRP1</i>
F1289	MATa, <i>bfa1::KanMX6, hit1::TRP1</i>
F1312	MATa, <i>Ycp50-LTE1(URA3)</i>
F1389	MATa, <i>hit1::HIT1-13Myc::KanMX6</i>
F1423	MATa, <i>hit1::TRP1, pds1::PDS1-3HA::HIS3MX6</i>
F1468	MATa, <i>KanMx6:GAL-URL-3HA-LTE1</i>
F1586	MATa, <i>pds1::PDS1-3HA::HIS3MX6</i>
F1609	MATa, <i>pRS316-pGAL1-10-HIT1::URA3</i>
F1633	MATa, <i>MET-CDC20::URA3, 3HA-CDC14</i>
F1634	MATa, <i>MET-CDC20::URA3, hit1::TRP1, 3HA-CDC14</i>
F1744	MATa, <i>hit1::HIT1-yEGFP-KanMX, nop1::NOP1-mCherry-natMX6</i>
F1921	MATa, <i>nop1::NOP1-3HA::TRP1, hit1::HIT1-13Myc::KanMX6</i>
F2000	MATa, <i>hit1::HIS3MX6</i>
F2038	MATa, <i>cdc5-1</i>
F2061	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, lte1::KanMX6, Ycp50-LTE1(URA3)</i>
F2065	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, Ycp50-LTE1(URA3)</i>
F2073	MATa, <i>MET-CDC20::URA3, 3HA-CDC14, cdc15::CDC15-as1(L99G)::URA3</i>
F2078	MATa, <i>fob1::FOB1-13Myc::HIS3MX6, hit1::HIS3MX6</i>
F2080	MATa, <i>fob1::FOB1-13Myc::HIS3MX6</i>
F2087	MATa, <i>cdc5-2 (msd2-1::URA3)</i>
F2126	MATa, <i>bfa1::KanMX6, hit1::HIS3MX6, KanMx6:GAL-URL-3HA-LTE1</i>
F2130	MATa, <i>bfa1::KanMX6, hit1::HIS3MX6, lte1::KanMX6, Ycp50-LTE1(URA3)</i>
F2168	MATa, <i>net1::net1-eGFP::URA3</i>
F2169	MATa, <i>net1::net1-eGFP::URA3, hit1::HIS3MX6</i>
F2186	MATa, <i>pRS316::URA3, cdc5-1</i>
F2187	MATa, <i>pRS316-pGAL1-10-HIT1::URA3, cdc5-1</i>
F2188	MATa, <i>pRS316::URA3, dbf2-2</i>
F2189	MATa, <i>pRS316-pGAL1-10-HIT1::URA3, dbf2-2</i>
F2190	MATa, <i>pRS316::URA3, tem1-3</i>

F2191	MATa, <i>pRS316-pGAL1-10-HIT1::URA3, tem1-3</i>
F2205	MATa, <i>MET-CDC20::URA3, 3HA-CDC14, cdc15::CDC15-as1(L99G)::URA3, hit1::HIS3MX6</i>
F2247	MATa, <i>hit1::HIT1-VN-KanMX6, nop1::NOP1-VC::HIS3MX6</i>
F2253	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, mad1::HIS3MX6</i>
F2297	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, KanMX6:GAL-URL-3HA-LTE1</i>
F2301	MATa, <i>net1::net1-eGFP::URA3, spc42::SPC42-mCherry::KanMX6</i>
F2303	MATa, <i>net1::net1-eGFP::URA3, hit1::HIS3MX6, spc42::SPC42-mCherry::KanMX6</i>
F2349	MATa, <i>mad2::kanMX6</i>
F2383	MATa, <i>tab6-1, hit1::HIS3MX6</i>
F2483	MATa, <i>fob1::TRP1</i>
F2484	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, fob1::TRP1</i>
F2491	MATa, <i>hit1::HIT1-VN-KanMX6, net1::NET1-VC::HIS3MX6</i>
F2508	MATa, <i>MET-CDC20::URA3, 3HA-CDC14, cdc15::CDC15-as1(L99G)::URA3, bns1::HIS3MX6, SPO12::kanMX</i>
F2539	MATa, <i>hit1::HIT1-VN::HIS3MX6, cdc14::CDC14-VC-KanMX6</i>
F2566	MATa, <i>cdc14::CDC14-VC-KanMX6, net1::NET1-VN::HIS3MX6</i>
F2601	MATa, <i>lte1::KanMX6, Ycp50-LTE1(URA3), tab6-1, hit1::HIS3MX6</i>
F2602	MATa, <i>Ycp50-LTE1(URA3), tab6-1</i>
F2603	MATa, <i>Ycp50-LTE1(URA3), tab6-1, hit1::HIS3MX6</i>
F2613	MATa, <i>rsa1::HIS3MX6</i>
F2614	MATa, <i>rsa1::HIS3MX6, lte1::KanMX6, Ycp50-LTE1(URA3)</i>
F2615	MATa, <i>ura3::pGALL-CDC14::URA3</i>
F2616	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, ura3::pGALL-CDC14::URA3</i>
F2618	MATa, <i>ura3::pGAL1-10-CDC14::URA3</i>
F2619	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, ura3::pGAL1-10-CDC14::URA3</i>
F2642	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, cdc5-1</i>
F2652	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, mad2::kanMX6</i>
F2665	MATa, <i>rsa1::HIS3MX6, Ycp50-LTE1(URA3)</i>
F2670	MATa, <i>cdc14::CDC14-VN::HIS3MX6, net1::NET1-VC::KanMX6</i>
F2673	MATa, <i>cdc14::CDC14-VN::KanMX6, nop1::NOP1-VC::HIS3MX6</i>
F2685	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, hht1::NatMX4 hht2::[H3S10A]-URA3</i>
F2690	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, cdc5-2 (msd2-1::URA3)</i>
F2692	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, cdc5-2 (msd2-1::URA3)</i>
F2702	MATa, <i>brn1-PK9::HIS3MX6</i>
F2730	MATa, <i>brn1-PK9::HIS3MX6, hit1::HIS3MX6</i>
F2765	MAT, <i>ycg1-10</i>
F2767	MATa, <i>HIS::yca4-2-MYC12</i>
F2796	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, ycg1-10</i>
F2810	MATa, <i>hit1::HIS3MX6, HIS::yca4-2-MYC12</i>
F2880	MATa, <i>MET-CDC20::URA3, 3HA-CDC14, cdc15::CDC15-as1(L99G)::URA3, HIS::yca4-2-MYC12</i>

F2884	MATa, <i>MET-CDC20::URA3, 3HA-CDC14, cdc15::CDC15-as1(L99G)::URA3, hit1::HIS3MX6, HIS::ycs4-2-MYC12</i>
--------------	---

TABLA M2: PLÁSMIDOS USADOS:

Plásmido	Inserto	Vector	Fuente
pF236	<i>pGAL1-10 HIT1</i>	pRS316	Esta tesis
pF247	<i>pGAL1-10 HIT1</i>	pRS304	Esta tesis
pF267	<i>pGAL1-10-HIT1</i>	pRS303	Esta tesis
pF270	<i>VN-His3MX6</i>	pFA6a	(Sung and Huh, 2007)
pF271	<i>VC-His3MX6</i>	pFA6a	(Sung and Huh, 2007)
pF272	<i>VN-KanMX6</i>	pFA6a	(Sung and Huh, 2007)
pF273	<i>VC-KanMX6</i>	pFA6a	(Sung and Huh, 2007)
pF302	<i>pGALL</i>	pRS306	Nuestro laboratorio
pF304	<i>pGAL1-10-CDC14</i>	pRS306	Esta tesis
pF305	<i>pGALL-CDC14</i>	pRS306	Esta tesis
pF203	<i>LTE1</i>	Ycp50	Nuestro laboratorio
pF80	-	pRS316	(Sikorski and Hieter, 1989)

TABLA M3: ANTICUERPOS PARA IF:

Proteína	Anticuerpo Primario		Anticuerpo Secundario	
	Tipo (compañía)	Dilución	Tipo (compañía)	Dilución
Nop1-3HA	anti-HA.11 monoclonal (Covance)	1:1000	Anti-ratón Cy3 (Jackson ImmunoResearch)	1:2000
Fob1-13Myc	anti-Myc 9E10 monoclonal (Covance)	1:150	Anti-ratón Cy3 (Jackson ImmunoResearch)	1:500
Fob1-3HA	anti-HA.11 monoclonal (Covance)	1:150	Anti-ratón Cy3 (Jackson ImmunoResearch)	1:500
Tubulina	Anti-tubulina (Abcam)	1:200	Anti-rata FITC (Jackson ImmunoResearch)	1:200
3HA-CDC14	Anti-Pgk1 (Invitrogen)	1:150	Anti-ratón FITC (Jackson ImmunoResearch)	1:1000
Hit1-13Myc	anti-Myc policlonal (Gramsh)	1:150	Anti-conejo FITC (Jackson ImmunoResearch)	1:2000

TABLA M4: ANTICUERPOS PARA WB:

Proteína	Anticuerpo Primario		Anticuerpo Secundario	
	Tipo (compañía)	Dilución	Tipo (compañía)	Dilución
GFP	JL-8 Living colors (Clontech)	1:1000	Anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000
Pds1-HA	HA.11 (Covance)	1:5000	Anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000
Hit1-13Myc	Myc9E10 (Covance)	1:5000	Anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000
Pgk1	Anti-Pgk1 (Invitrogen)	1:20000	Anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000
β-Actina	Anti-β-Actina (Abcam)	1:7000	Anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000
Clb2	Anti-Clb2 (Santa Cruz)	1:2000	Anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000

Los anticuerpos secundarios están acoplados a la peroxidasa de rábano (*HorseRadish Peroxidase*, HRP) para su detección.

TABLA M5: CEBADORES PARA qPCR:

Locus	Cebadores	Secuencia (5' → 3')
ADNr (pareja 1)	SC-39	CACACTTGTACTCCATGACTAAACC
	SC-40	GACAGAGAGGGCAAAAGAAAA
ADNr (pareja 2)	SC-41	TTTCTGCCTTTTTTCGGTGAC
	SC-42	TGGCATGGATTTCCTTTAG
<i>TUB2</i>	SC-83	CGGCCAATTGAACTCTGATT
	SC-84	AGCCGACCATGAAGAAATGT

Estos cebadores fueron previamente utilizados en (Cuylen et al., 2011).

7. BIBLIOGRAFÍA:

- Amon, A. (1996). Mother and daughter are doing fine: asymmetric cell division in yeast. *Cell* 84, 651-654.
- Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M., and Lamond, A.I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* 12, 1-11.
- Azzam, R., Chen, S.L., Shou, W., Mah, A.S., Alexandru, G., Nasmyth, K., Annan, R.S., Carr, S.A., and Deshaies, R.J. (2004). Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science* 305, 516-519.
- Bairwa, N.K., Zzaman, S., Mohanty, B.K., and Bastia, D. (2010). Replication fork arrest and rDNA silencing are two independent and separable functions of the replication terminator protein Fob1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 285, 12612-12619.
- Balakin, A.G., Smith, L., and Fournier, M.J. (1996). The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* 86, 823-834.
- Bardin, A.J., and Amon, A. (2001). Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 815-826.
- Bardin, A.J., Visintin, R., and Amon, A. (2000). A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell* 102, 21-31.
- Baskerville, C., Segal, M., and Reed, S.I. (2008). The protease activity of yeast separase (esp1) is required for anaphase spindle elongation independently of its role in cleavage of cohesin. *Genetics* 178, 2361-2372.
- Bassermann, F., Frescas, D., Guardavaccaro, D., Busino, L., Peschiaroli, A., and Pagano, M. (2008). The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* 134, 256-267.
- Bassler, J., Grandi, P., Gadal, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell* 8, 517-529.
- Baumer, M., Braus, G.H., and Irniger, S. (2000). Two different modes of cyclin clb2 proteolysis during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 468, 142-148.
- Baxter-Roshek, J.L., Petrov, A.N., and Dinman, J.D. (2007). Optimization of ribosome structure and function by rRNA base modification. *PLoS One* 2, e174.
- Bazile, F., St-Pierre, J., and D'Amours, D. (2010). Three-step model for condensin activation during mitotic chromosome condensation. *Cell Cycle* 9, 3243-3255.

Bhalla, N., Biggins, S., and Murray, A.W. (2002). Mutation of YCS4, a budding yeast condensin subunit, affects mitotic and nonmitotic chromosome behavior. *Mol Biol Cell* 13, 632-645.

Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., *et al.* (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* 407, 395-401.

Bizarro, J., Charron, C., Boulon, S., Westman, B., Pradet-Balade, B., Vandermoere, F., Chagot, M.E., Hallais, M., Ahmad, Y., Leonhardt, H., *et al.* (2014). Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control. *J Cell Biol* 207, 463-480.

Bizarro, J., Dodre, M., Huttin, A., Charpentier, B., Schlotter, F., Branlant, C., Verheggen, C., Massenet, S., and Bertrand, E. (2015). NUFIP and the HSP90/R2TP chaperone bind the SMN complex and facilitate assembly of U4-specific proteins. *Nucleic Acids Res* 43, 8973-8989.

Bloom, J., Cristea, I.M., Procko, A.L., Lubkov, V., Chait, B.T., Snyder, M., and Cross, F.R. (2011). Global analysis of Cdc14 phosphatase reveals diverse roles in mitotic processes. *J Biol Chem* 286, 5434-5445.

Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 149-160.

Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J., and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 574-585.

Booher, R.N., Deshaies, R.J., and Kirschner, M.W. (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J* 12, 3417-3426.

Boulon, S., Marmier-Gourrier, N., Pradet-Balade, B., Wurth, L., Verheggen, C., Jady, B.E., Rothe, B., Pescia, C., Robert, M.C., Kiss, T., *et al.* (2008). The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J Cell Biol* 180, 579-595.

Brewer, B.J. (1988). When polymerases collide: replication and the transcriptional organization of the *E. coli* chromosome. *Cell* 53, 679-686.

Brito, G.C., Fachel, A.A., Vettore, A.L., Vignal, G.M., Gimba, E.R., Campos, F.S., Barcinski, M.A., Verjovski-Almeida, S., and Reis, E.M. (2008). Identification of protein-coding and intronic noncoding RNAs down-regulated in clear cell renal carcinoma. *Mol Carcinog* 47, 757-767.

Brito, I.L., Monje-Casas, F., and Amon, A. (2010). The Lrs4-Csm1 monopolin complex associates with kinetochores during anaphase and is required for accurate chromosome segregation. *Cell Cycle* 9, 3611-3618.

Byrne, K.P., and Wolfe, K.H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* 15, 1456-1461.

Bystricky, K., Heun, P., Gehlen, L., Langowski, J., and Gasser, S.M. (2004). Long-range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analyzed by high-resolution imaging techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16495-16500.

Calabria, I., Baro, B., Rodriguez-Rodriguez, J.A., Russinol, N., and Queralt, E. (2012). Zds1 regulates PP2A(Cdc55) activity and Cdc14 activation during mitotic exit through its Zds_C motif. *Journal of cell science* 125, 2875-2884.

Caydasi, A.K., Ibrahim, B., and Pereira, G. (2010). Monitoring spindle orientation: Spindle position checkpoint in charge. *Cell division* 5, 28.

Caydasi, A.K., Lohel, M., Grunert, G., Dittrich, P., Pereira, G., and Ibrahim, B. (2012). A dynamical model of the spindle position checkpoint. *Mol Syst Biol* 8, 582.

Chan, L.Y., and Amon, A. (2010). Spindle position is coordinated with cell-cycle progression through establishment of mitotic exit-activating and -inhibitory zones. *Molecular cell* 39, 444-454.

Chedin, S., Laferte, A., Hoang, T., Lafontaine, D.L., Riva, M., and Carles, C. (2007). Is ribosome synthesis controlled by pol I transcription? *Cell Cycle* 6, 11-15.

Ciccio, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell* 40, 179-204.

Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 93, 1067-1076.

Clemente-Blanco, A., Mayan-Santos, M., Schneider, D.A., Machin, F., Jarmuz, A., Tschochner, H., and Aragon, L. (2009). Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature* 458, 219-222.

Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., and Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* 10, 3081-3093.

Cuylen, S., and Haering, C.H. (2011). Deciphering condensin action during chromosome segregation. *Trends Cell Biol* 21, 552-559.

Cuylen, S., Metz, J., and Haering, C.H. (2011). Condensin structures chromosomal DNA through topological links. *Nat Struct Mol Biol* 18, 894-901.

D'Amours, D., and Amon, A. (2004). At the interface between signaling and executing anaphase--Cdc14 and the FEAR network. *Genes Dev* 18, 2581-2595.

D'Amours, D., Stegmeier, F., and Amon, A. (2004). Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell* 117, 455-469.

D'Aquino, K.E., Monje-Casas, F., Paulson, J., Reiser, V., Charles, G.M., Lai, L., Shokat, K.M., and Amon, A. (2005). The protein kinase Kin4 inhibits exit from mitosis in response to spindle position defects. *Mol Cell* 19, 223-234.

Decatur, W.A., and Fournier, M.J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* 27, 344-351.

Deery, E.C., Vithana, E.N., Newbold, R.J., Gallon, V.A., Bhattacharya, S.S., Warren, M.J., Hunt, D.M., and Wilkie, S.E. (2002). Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by mutations in the splicing factor gene PRPF31. *Hum Mol Genet* 11, 3209-3219.

Derenzini, M., Pasquinelli, G., O'Donohue, M.F., Ploton, D., and Thiry, M. (2006). Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem* 54, 131-145.

Duan, Z., Andronescu, M., Schutz, K., McIlwain, S., Kim, Y.J., Lee, C., Shendure, J., Fields, S., Blau, C.A., and Noble, W.S. (2010). A three-dimensional model of the yeast genome. *Nature* 465, 363-367.

Dumitrescu, T.P., and Saunders, W.S. (2002). The FEAR Before MEN: networks of mitotic exit. *Cell Cycle* 1, 304-307.

Earnshaw, W.C., Halligan, B., Cooke, C.A., Heck, M.M., and Liu, L.F. (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol* 100, 1706-1715.

Falk, J.E., Tsuchiya, D., Verdaasdonk, J., Lacefield, S., Bloom, K., and Amon, A. (2016). Spatial signals link exit from mitosis to spindle position. *Elife* 5.

Faust, A.M., Wong, C.C., Yates, J.R., 3rd, Drubin, D.G., and Barnes, G. (2013). The FEAR protein Slk19 restricts Cdc14 phosphatase to the nucleus until the end of anaphase, regulating its participation in mitotic exit in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8, e73194.

Finn, K., Lowndes, N.F., and Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci* 69, 1447-1473.

Fitch, I., Dahmann, C., Surana, U., Amon, A., Nasmyth, K., Goetsch, L., Byers, B., and Futcher, B. (1992). Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 3, 805-818.

Fraschini, R., Venturetti, M., Chirolì, E., and Piatti, S. (2008). The spindle position checkpoint: how to deal with spindle misalignment during asymmetric cell division in budding yeast. *Biochemical Society transactions* 36, 416-420.

Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., and Strunnikov, A. (2000). The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *J Cell Biol* 149, 811-824.

French, S.L., Osheim, Y.N., Cioci, F., Nomura, M., and Beyer, A.L. (2003). In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol* 23, 1558-1568.

Fritze, C.E., Verschueren, K., Strich, R., and Easton Esposito, R. (1997). Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *EMBO J* 16, 6495-6509.

Gadal, O., Strauss, D., Kessl, J., Trumpower, B., Tollervey, D., and Hurt, E. (2001). Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* 21, 3405-3415.

Gartenberg, M.R., and Merckenschlager, M. (2008). Condensin goes with the family but not with the flow. *Genome Biol* 9, 236.

Geil, C., Schwab, M., and Seufert, W. (2008). A nucleolus-localized activator of Cdc14 phosphatase supports rDNA segregation in yeast mitosis. *Curr Biol* 18, 1001-1005.

Geymonat, M., Spanos, A., de Bettignies, G., and Sedgwick, S.G. (2009). Lte1 contributes to Bfa1 localization rather than stimulating nucleotide exchange by Tem1. *J Cell Biol* 187, 497-511.

Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96.

Gillies, J., Hickey, C.M., Su, D., Wu, Z., Peng, J., and Hochstrasser, M. (2016). SUMO Pathway Modulation of Regulatory Protein Binding at the Ribosomal DNA Locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 202, 1377-1394.

Gleizes, P.E., Noaillac-Depeyre, J., Leger-Silvestre, I., Teulier, F., Dauxois, J.Y., Pommet, D., Azum-Gelade, M.C., and Gas, N. (2001). Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J Cell Biol* 155, 923-936.

Gottschling, D.E. (2000). Gene silencing: two faces of SIR2. *Curr Biol* 10, R708-711.

Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Zakian, V.A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63, 751-762.

Grandin, N., and Reed, S.I. (1993). Differential function and expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-type cyclins in mitosis and meiosis. *Mol Cell Biol* 13, 2113-2125.

Grether, M.E., and Herskowitz, I. (1999). Genetic and biochemical characterization of the yeast spo12 protein. *Mol Biol Cell* 10, 3689-3703.

Gruneberg, U., Campbell, K., Simpson, C., Grindlay, J., and Schiebel, E. (2000). Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *EMBO J* 19, 6475-6488.

Guarente, L. (2000). Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev* 14, 1021-1026.

Haering, C.H., Lowe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* 9, 773-788.

Harrison, J.C., and Haber, J.E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annual review of genetics* 40, 209-235.

Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46-51.

Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S., and Grunstein, M. (1999). Mapping DNA interaction sites of chromosomal proteins. Crosslinking studies in yeast. *Methods Mol Biol* 119, 469-479.

Hernandez-Verdun, D. (2006). Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 125, 127-137.

Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52, 536-553.

Hilioti, Z., Chung, Y.S., Mochizuki, Y., Hardy, C.F., and Cohen-Fix, O. (2001). The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner. *Current biology : CB* 11, 1347-1352.

Hirano, T. (2005a). Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol* 15, R265-275.

Hirano, T. (2005b). SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 507-514.

Hiraoka, Y., Minden, J.S., Swedlow, J.R., Sedat, J.W., and Agard, D.A. (1989). Focal points for chromosome condensation and decondensation revealed by three-dimensional in vivo time-lapse microscopy. *Nature* 342, 293-296.

Horvath, A., and Riezman, H. (1994). Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1305-1310.

Hoskins, A.A., and Moore, M.J. (2012). The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends Biochem Sci* 37, 179-188.

Hu, F., Wang, Y., Liu, D., Li, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell* 107, 655-665.

Huang, J., and Moazed, D. (2003). Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. *Genes Dev* 17, 2162-2176.

Huranova, M., Hnilicova, J., Fleischer, B., Cvackova, Z., and Stanek, D. (2009). A mutation linked to retinitis pigmentosa in HPRP31 causes protein instability and impairs its interactions with spliceosomal snRNPs. *Hum Mol Genet* 18, 2014-2023.

Hwang, W.W., and Madhani, H.D. (2009). Nonredundant requirement for multiple histone modifications for the early anaphase release of the mitotic exit regulator Cdc14 from nucleolar chromatin. *PLoS Genet* 5, e1000588.

Ibrahim, B. (2015). Toward a systems-level view of mitotic checkpoints. *Prog Biophys Mol Biol* 117, 217-224.

Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., and Kobayashi, T. (2010). Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* 327, 693-696.

Jansen, R.P., Hurt, E.C., Kern, H., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., Lapeyre, B., and Tollervey, D. (1991). Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. *J Cell Biol* 113, 715-729.

Jaspersen, S.L., Charles, J.F., and Morgan, D.O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 9, 227-236.

Jaspersen, S.L., Charles, J.F., Tinker-Kulberg, R.L., and Morgan, D.O. (1998). A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 9, 2803-2817.

Jaspersen, S.L., and Morgan, D.O. (2000). Cdc14 activates cdc15 to promote mitotic exit in budding yeast. *Curr Biol* 10, 615-618.

Jin, F., Bokros, M., and Wang, Y. (2016). Premature Silencing of the Spindle Assembly Checkpoint Is Prevented by the Bub1-H2A-Sgo1-PP2A Axis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.

Jin, F., Liu, H., Liang, F., Rizkallah, R., Hurt, M.M., and Wang, Y. (2008). Temporal control of the dephosphorylation of Cdk substrates by mitotic exit pathways in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16177-16182.

Johnson, D.G., and Walker, C.L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 295-312.

Karbstein, K., and Doudna, J.A. (2006). GTP-dependent formation of a ribonucleoprotein subcomplex required for ribosome biogenesis. *J Mol Biol* 356, 432-443.

Kawakami, K., Shafer, B.K., Garfinkel, D.J., Strathern, J.N., and Nakamura, Y. (1992). Ty element-induced temperature-sensitive mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 131, 821-832.

Kellogg, D.R. (2003). Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J Cell Sci* 116, 4883-4890.

Kiss, T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109, 145-148.

Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85, 1077-1088.

Knapp, D., Bhoite, L., Stillman, D.J., and Nasmyth, K. (1996). The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40SIC1. *Mol Cell Biol* 16, 5701-5707.

Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J., and Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* 3, 1279-1294.

Kobayashi, T. (2003). The replication fork barrier site forms a unique structure with Fob1p and inhibits the replication fork. *Mol Cell Biol* 23, 9178-9188.

Kobayashi, T., and Ganley, A.R. (2005). Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science* 309, 1581-1584.

Kobayashi, T., Heck, D.J., Nomura, M., and Horiuchi, T. (1998). Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev* 12, 3821-3830.

Komarnitsky, S.I., Chiang, Y.C., Luca, F.C., Chen, J., Toyn, J.H., Winey, M., Johnston, L.H., and Denis, C.L. (1998). DBF2 protein kinase binds to and acts through the cell cycle-regulated MOB1 protein. *Mol Cell Biol* 18, 2100-2107.

Konig, C., Maekawa, H., and Schiebel, E. (2010). Mutual regulation of cyclin-dependent kinase and the mitotic exit network. *J Cell Biol* 188, 351-368.

Kos, M., and Tollervey, D. (2010). Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol Cell* 37, 809-820.

Lafontaine, D.L., and Tollervey, D. (1999). Nop58p is a common component of the box C+D snoRNPs that is required for snoRNA stability. *RNA* 5, 455-467.

Lafontaine, D.L., and Tollervey, D. (2000). Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNPs. *Mol Cell Biol* 20, 2650-2659.

Lam, Y.W., Lamond, A.I., Mann, M., and Andersen, J.S. (2007). Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr Biol* 17, 749-760.

Lam, Y.W., Trinkle-Mulcahy, L., and Lamond, A.I. (2005). The nucleolus. *J Cell Sci* 118, 1335-1337.

Laurenson, P., and Rine, J. (1992). Silencers, silencing, and heritable transcriptional states. *Microbiol Rev* 56, 543-560.

- Lavoie, B.D., Hogan, E., and Koshland, D. (2002). In vivo dissection of the chromosome condensation machinery: reversibility of condensation distinguishes contributions of condensin and cohesin. *J Cell Biol* 156, 805-815.
- Lavoie, B.D., Hogan, E., and Koshland, D. (2004). In vivo requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding. *Genes Dev* 18, 76-87.
- Lees, E.M., and Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol* 13, 1194-1201.
- Leger-Silvestre, I., Trumtel, S., Noaillac-Depeyre, J., and Gas, N. (1999). Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 108, 103-113.
- Lew, D.J. (2003). The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr Opin Cell Biol* 15, 648-653.
- Lew, D.J., and Burke, D.J. (2003). The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu Rev Genet* 37, 251-282.
- Lewis, C.D., and Laemmli, U.K. (1982). Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell* 29, 171-181.
- Liang, F., Jin, F., Liu, H., and Wang, Y. (2009a). The molecular function of the yeast polo-like kinase Cdc5 in Cdc14 release during early anaphase. *Molecular biology of the cell* 20, 3671-3679.
- Liang, X.H., Liu, Q., and Fournier, M.J. (2009b). Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA* 15, 1716-1728.
- Lin, J., Lai, S., Jia, R., Xu, A., Zhang, L., Lu, J., and Ye, K. (2011). Structural basis for site-specific ribose methylation by box C/D RNA protein complexes. *Nature* 469, 559-563.
- Lo, S.J., Lee, C.C., and Lai, H.J. (2006). The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings. *Cell Res* 16, 530-538.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Lustig, A.J. (1998). Mechanisms of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* 8, 233-239.
- Machado-Pinilla, R., Liger, D., Leulliot, N., and Meier, U.T. (2012). Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. *RNA* 18, 1833-1845.

Machin, F., Torres-Rosell, J., Jarmuz, A., and Aragon, L. (2005). Spindle-independent condensation-mediated segregation of yeast ribosomal DNA in late anaphase. *J Cell Biol* 168, 209-219.

Maekawa, H., Priest, C., Lechner, J., Pereira, G., and Schiebel, E. (2007). The yeast centrosome translates the positional information of the anaphase spindle into a cell cycle signal. *J Cell Biol* 179, 423-436.

Mah, A.S., Jang, J., and Deshaies, R.J. (2001). Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7325-7330.

Mailand, N., Lukas, C., Kaiser, B.K., Jackson, P.K., Bartek, J., and Lukas, J. (2002). Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 4, 317-322.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.

Manders, E.M., Kimura, H., and Cook, P.R. (1999). Direct imaging of DNA in living cells reveals the dynamics of chromosome formation. *J Cell Biol* 144, 813-821.

McKeegan, K.S., Debieux, C.M., Boulon, S., Bertrand, E., and Watkins, N.J. (2007). A dynamic scaffold of pre-snoRNP factors facilitates human box C/D snoRNP assembly. *Mol Cell Biol* 27, 6782-6793.

McKeegan, K.S., Debieux, C.M., and Watkins, N.J. (2009). Evidence that the AAA+ proteins TIP48 and TIP49 bridge interactions between 15.5K and the related NOP56 and NOP58 proteins during box C/D snoRNP biogenesis. *Mol Cell Biol* 29, 4971-4981.

McStay, B. (2016). Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination. *Genes Dev* 30, 1598-1610.

Melese, T., and Xue, Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 7, 319-324.

Miyoshi, K., Shirai, C., and Mizuta, K. (2003). Transcription of genes encoding trans-acting factors required for rRNA maturation/ribosomal subunit assembly is coordinately regulated with ribosomal protein genes and involves Rap1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 31, 1969-1973.

Mocciaro, A., and Schiebel, E. (2010). Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions? *J Cell Sci* 123, 2867-2876.

Mohanty, B.K., and Bastia, D. (2004). Binding of the replication terminator protein Fob1p to the Ter sites of yeast causes polar fork arrest. *J Biol Chem* 279, 1932-1941.

Mohl, D.A., Huddleston, M.J., Collingwood, T.S., Annan, R.S., and Deshaies, R.J. (2009). Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis. *J Cell Biol* 184, 527-539.

Molk, J.N., Schuyler, S.C., Liu, J.Y., Evans, J.G., Salmon, E.D., Pellman, D., and Bloom, K. (2004). The differential roles of budding yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p protein dynamics in mitotic exit. *Molecular biology of the cell* 15, 1519-1532.

Monje-Casas, F., and Amon, A. (2009). Cell polarity determinants establish asymmetry in MEN signaling. *Dev Cell* 16, 132-145.

Munoz-Barrera, M., Aguilar, I., and Monje-Casas, F. (2015). Dispensability of the SAC Depends on the Time Window Required by Aurora B to Ensure Chromosome Biorientation. *PLoS One* 10, e0144972.

Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.

Nasmyth, K. (1996). At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet* 12, 405-412.

Nissan, T.A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J* 21, 5539-5547.

Nitiss, J.L. (2009). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer* 9, 327-337.

Nomura, M. (2001). Ribosomal RNA genes, RNA polymerases, nucleolar structures, and synthesis of rRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66, 555-565.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-508.

O'Sullivan, J.M., Pai, D.A., Cridge, A.G., Engelke, D.R., and Ganley, A.R. (2013). The nucleolus: a raft adrift in the nuclear sea or the keystone in nuclear structure? *Biomol Concepts* 4, 277-286.

Panse, S.L., Masson, C., Heliot, L., Chassery, J.M., Junera, H.R., and Hernandez-Verdun, D. (1999). 3-D organization of ribosomal transcription units after DRB inhibition of RNA polymerase II transcription. *J Cell Sci* 112 (Pt 13), 2145-2154.

Pereira, G., Hofken, T., Grindlay, J., Manson, C., and Schiebel, E. (2000). The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol Cell* 6, 1-10.

Pereira, G., Manson, C., Grindlay, J., and Schiebel, E. (2002). Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. *J Cell Biol* 157, 367-379.

Pereira, G., and Schiebel, E. (2005). Kin4 kinase delays mitotic exit in response to spindle alignment defects. *Molecular cell* 19, 209-221.

Pesin, J.A., and Orr-Weaver, T.L. (2008). Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 475-499.

Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 644-656.

Petes, T.D., and Botstein, D. (1977). Simple Mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5091-5095.

Pinsky, B.A., Kung, C., Shokat, K.M., and Biggins, S. (2006). The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat Cell Biol* 8, 78-83.

Planta, R.J., and Mager, W.H. (1998). The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 471-477.

Poll, G., Braun, T., Jakovljevic, J., Neueder, A., Jakob, S., Woolford, J.L., Jr., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2009). rRNA maturation in yeast cells depleted of large ribosomal subunit proteins. *PLoS One* 4, e8249.

Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., and Uhlmann, F. (2006). Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell* 125, 719-732.

Queralt, E., and Uhlmann, F. (2008a). Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit. *Curr Opin Cell Biol* 20, 661-668.

Queralt, E., and Uhlmann, F. (2008b). Separase cooperates with Zds1 and Zds2 to activate Cdc14 phosphatase in early anaphase. *J Cell Biol* 182, 873-883.

Raska, I., Shaw, P.J., and Cmarko, D. (2006). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* 18, 325-334.

Reijo, R.A., Cho, D.S., and Huffaker, T.C. (1993). Deletion of a single-copy tRNA affects microtubule function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 135, 955-962.

Richmond, D., Rizkallah, R., Liang, F., Hurt, M.M., and Wang, Y. (2013). Slk19 clusters kinetochores and facilitates chromosome bipolar attachment. *Mol Biol Cell* 24, 566-577.

Rine, J., and Herskowitz, I. (1987). Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 116, 9-22.

Rock, J.M., and Amon, A. (2009). The FEAR network. *Curr Biol* 19, R1063-1068.

Rock, J.M., Lim, D., Stach, L., Ogradowicz, R.W., Keck, J.M., Jones, M.H., Wong, C.C., Yates, J.R., 3rd, Winey, M., Smerdon, S.J., *et al.* (2013). Activation of the yeast Hippo pathway by phosphorylation-dependent assembly of signaling complexes. *Science* 340, 871-875.

Rodriguez-Rodriguez, J.A., Moyano, Y., Jativa, S., and Queralt, E. (2016). Mitotic Exit Function of Polo-like Kinase Cdc5 Is Dependent on Sequential Activation by Cdk1. *Cell Rep* 15, 2050-2062.

Rosete, M., Padros, M.R., and Vindrola, O. (2007). [The nucleolus as a regulator of cellular senescence]. *Medicina (B Aires)* 67, 183-194.

Ross, K.E., Kaldis, P., and Solomon, M.J. (2000). Activating phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclin-dependent kinase, cdc28p, precedes cyclin binding. *Mol Biol Cell* 11, 1597-1609.

Rossio, V., Kazatskaya, A., Hirabayashi, M., and Yoshida, S. (2014). Comparative genetic analysis of PP2A-Cdc55 regulators in budding yeast. *Cell Cycle* 13, 2073-2083.

Rossio, V., and Yoshida, S. (2011). Spatial regulation of Cdc55-PP2A by Zds1/Zds2 controls mitotic entry and mitotic exit in budding yeast. *J Cell Biol* 193, 445-454.

Rothe, B., Saliou, J.M., Quinternet, M., Back, R., Tiotiu, D., Jacquemin, C., Loegler, C., Schlotter, F., Pena, V., Eckert, K., *et al.* (2014). Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction. *Nucleic Acids Res* 42, 10731-10747.

Rupes, I. (2002). Checking cell size in yeast. *Trends Genet* 18, 479-485.

Schafer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J* 22, 1370-1380.

Scheer, U., and Hock, R. (1999). Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 11, 385-390.

Scheer, U., and Rose, K.M. (1984). Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1431-1435.

Schibler, A., Koutelou, E., Tomida, J., Wilson-Pham, M., Wang, L., Lu, Y., Cabrera, A.P., Chosed, R.J., Li, W., Li, B., *et al.* (2016). Histone H3K4 methylation regulates deactivation of the spindle assembly checkpoint through direct binding of Mad2. *Genes Dev* 30, 1187-1197.

Schubert, T., Pusch, M.C., Diermeier, S., Benes, V., Kremmer, E., Imhof, A., and Langst, G. (2012). Df31 protein and snoRNAs maintain accessible higher-order structures of chromatin. *Mol Cell* 48, 434-444.

Schwab, M., Lutum, A.S., and Seufert, W. (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* 90, 683-693.

Segal, M. (2011). Mitotic exit control: a space and time odyssey. *Curr Biol* 21, R857-859.

Shalgi, R., Hurt, J.A., Krykbaeva, I., Taipale, M., Lindquist, S., and Burge, C.B. (2013). Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock. *Mol Cell* 49, 439-452.

Sheff, M.A., and Thorn, K.S. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 661-670.

Shirayama, M., Matsui, Y., and Toh, E.A. (1994). The yeast TEM1 gene, which encodes a GTP-binding protein, is involved in termination of M phase. *Mol Cell Biol* 14, 7476-7482.

Shou, W., Sakamoto, K.M., Keener, J., Morimoto, K.W., Traverso, E.E., Azzam, R., Hoppe, G.J., Feldman, R.M., DeModena, J., Moazed, D., *et al.* (2001). Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit. *Mol Cell* 8, 45-55.

Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H., and Deshaies, R.J. (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97, 233-244.

Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

Simanis, V. (2003). Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts. *J Cell Sci* 116, 4263-4275.

Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129, 13-31.

Smith, J.S., and Boeke, J.D. (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev* 11, 241-254.

Smith, J.S., Caputo, E., and Boeke, J.D. (1999). A genetic screen for ribosomal DNA silencing defects identifies multiple DNA replication and chromatin-modulating factors. *Mol Cell Biol* 19, 3184-3197.

Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Molecular biology of the cell* 9, 3273-3297.

St-Pierre, J., Douziech, M., Bazile, F., Pascariu, M., Bonneil, E., Sauve, V., Ratsima, H., and D'Amours, D. (2009). Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity. *Mol Cell* 34, 416-426.

Stegmeier, F., and Amon, A. (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet* 38, 203-232.

Stegmeier, F., Huang, J., Rahal, R., Zmolik, J., Moazed, D., and Amon, A. (2004). The replication fork block protein Fob1 functions as a negative regulator of the FEAR network. *Curr Biol* 14, 467-480.

Stegmeier, F., Visintin, R., and Amon, A. (2002). Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* 108, 207-220.

Straight, A.F., Shou, W., Dowd, G.J., Turck, C.W., Deshaies, R.J., Johnson, A.D., and Moazed, D. (1999). Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* 97, 245-256.

Sullivan, M., Higuchi, T., Katis, V.L., and Uhlmann, F. (2004). Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. *Cell* 117, 471-482.

Sullivan, M., Lehane, C., and Uhlmann, F. (2001). Orchestrating anaphase and mitotic exit: separase cleavage and localization of Slk19. *Nat Cell Biol* 3, 771-777.

Sullivan, M., and Morgan, D.O. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 894-903.

Sullivan, M., and Uhlmann, F. (2003). A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. *Nat Cell Biol* 5, 249-254.

Sung, M.K., and Huh, W.K. (2007). Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24, 767-775.

Tanaka, T.U., Stark, M.J., and Tanaka, K. (2005). Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 929-942.

Teytelman, L., Thurtle, D.M., Rine, J., and van Oudenaarden, A. (2013). Highly expressed loci are vulnerable to misleading ChIP localization of multiple unrelated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18602-18607.

Thadani, R., and Uhlmann, F. (2015). Chromosome condensation: weaving an untangled web. *Curr Biol* 25, R663-666.

Thiry, M., and Lafontaine, D.L. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol* 15, 194-199.

Thuret, J.Y., Valay, J.G., Faye, G., and Mann, C. (1996). Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell* 86, 565-576.

Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E.C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72, 443-457.

Tomson, B.N., D'Amours, D., Adamson, B.S., Aragon, L., and Amon, A. (2006). Ribosomal DNA transcription-dependent processes interfere with chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 26, 6239-6247.

Tomson, B.N., Rahal, R., Reiser, V., Monje-Casas, F., Mekhail, K., Moazed, D., and Amon, A. (2009). Regulation of Spo12 phosphorylation and its essential role in the FEAR network. *Curr Biol* 19, 449-460.

Torres-Rosell, J., Machin, F., Jarmuz, A., and Aragon, L. (2004). Nucleolar segregation lags behind the rest of the genome and requires Cdc14p activation by the FEAR network. *Cell Cycle* 3, 496-502.

Toyn, J.H., Johnson, A.L., Donovan, J.D., Toone, W.M., and Johnston, L.H. (1997). The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. *Genetics* 145, 85-96.

Traverso, E.E., Baskerville, C., Liu, Y., Shou, W., James, P., Deshaies, R.J., and Charbonneau, H. (2001). Characterization of the Net1 cell cycle-dependent regulator of the Cdc14 phosphatase from budding yeast. *J Biol Chem* 276, 21924-21931.

Trumtel, S., Leger-Silvestre, I., Gleizes, P.E., Teulieres, F., and Gas, N. (2000). Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Mol Biol Cell* 11, 2175-2189.

Tsang, C.K., Li, H., and Zheng, X.S. (2007). Nutrient starvation promotes condensin loading to maintain rDNA stability. *EMBO J* 26, 448-458.

Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13, 255-263.

Tyers, M., Tokiwa, G., and Futcher, B. (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J* 12, 1955-1968.

Tyson, J.J., Chen, K., and Novak, B. (2001). Network dynamics and cell physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 908-916.

Tyson, J.J., Novak, B., Chen, K., and Val, J. (1995). Checkpoints in the cell cycle from a modeler's perspective. *Prog Cell Cycle Res* 1, 1-8.

Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400, 37-42.

Valerio-Santiago, M., de Los Santos-Velazquez, A.I., and Monje-Casas, F. (2013). Inhibition of the mitotic exit network in response to damaged telomeres. *PLoS Genet* 9, e1003859.

Valerio-Santiago, M., and Monje-Casas, F. (2011). Tem1 localization to the spindle pole bodies is essential for mitotic exit and impairs spindle checkpoint function. *J Cell Biol* 192, 599-614.

van der Feltz, C., Anthony, K., Brilot, A., and Pomeranz Krummel, D.A. (2012). Architecture of the spliceosome. *Biochemistry* 51, 3321-3333.

Varela, E., Shimada, K., Laroche, T., Leroy, D., and Gasser, S.M. (2009). Lte1, Cdc14 and MEN-controlled Cdk inactivation in yeast coordinate rDNA decompaction with late telophase progression. *EMBO J* 28, 1562-1575.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131-149.

Visintin, R., and Amon, A. (2001). Regulation of the mitotic exit protein kinases Cdc15 and Dbf2. *Mol Biol Cell* 12, 2961-2974.

Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, A. (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2, 709-718.

Visintin, R., Hwang, E.S., and Amon, A. (1999). Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* 398, 818-823.

Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 278, 460-463.

Visintin, R., Stegmeier, F., and Amon, A. (2003). The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. *Mol Biol Cell* 14, 4486-4498.

Vithana, E.N., Abu-Safieh, L., Allen, M.J., Carey, A., Papaioannou, M., Chakarova, C., Al-Magthteh, M., Ebenezer, N.D., Willis, C., Moore, A.T., *et al.* (2001). A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol Cell* 8, 375-381.

Wahl, M.C., Will, C.L., and Luhrmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-718.

Walczak, C.E., Cai, S., and Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 91-102.

Walters, A.D., May, C.K., Dauster, E.S., Cinquin, B.P., Smith, E.A., Robellet, X., D'Amours, D., Larabell, C.A., and Cohen-Fix, O. (2014). The yeast polo kinase Cdc5 regulates the shape of the mitotic nucleus. *Curr Biol* 24, 2861-2867.

Wan, J., Xu, H., and Grunstein, M. (1992). CDC14 of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, sequence analysis, and transcription during the cell cycle. *J Biol Chem* 267, 11274-11280.

Wang, B.D., Butylin, P., and Strunnikov, A. (2006). Condensin function in mitotic nucleolar segregation is regulated by rDNA transcription. *Cell Cycle* 5, 2260-2267.

Wang, B.D., Yong-Gonzalez, V., and Strunnikov, A.V. (2004). Cdc14p/FEAR pathway controls segregation of nucleolus in *S. cerevisiae* by facilitating condensin targeting to rDNA chromatin in anaphase. *Cell Cycle* 3, 960-967.

Wang, D., Mansisidor, A., Prabhakar, G., and Hochwagen, A. (2016). Condensin and Hmo1 Mediate a Starvation-Induced Transcriptional Position Effect within the Ribosomal DNA Array. *Cell Rep* 14, 1010-1017.

Wang, Y., Hu, F., and Elledge, S.J. (2000). The Bfa1/Bub2 GAP complex comprises a universal checkpoint required to prevent mitotic exit. *Current biology : CB* 10, 1379-1382.

Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24, 437-440.

Warner, J.R., and Gorenstein, C. (1977). The synthesis of eucaryotic ribosomal proteins in vitro. *Cell* 11, 201-212.

Wasch, R., and Cross, F.R. (2002). APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* 418, 556-562.

Watkins, N.J., and Bohnsack, M.T. (2012). The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 397-414.

Watkins, N.J., Newman, D.R., Kuhn, J.F., and Maxwell, E.S. (1998). In vitro assembly of the mouse U14 snoRNP core complex and identification of a 65-kDa box C/D-binding protein. *RNA* 4, 582-593.

Watkins, N.J., Segault, V., Charpentier, B., Nottrott, S., Fabrizio, P., Bachi, A., Wilm, M., Rosbash, M., Branlant, C., and Luhrmann, R. (2000). A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell* 103, 457-466.

Wickner, R.B., Koh, T.J., Crowley, J.C., O'Neil, J., and Kaback, D.B. (1987). Molecular cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of the MAK16 gene and analysis of an adjacent gene essential for growth at low temperatures. *Yeast* 3, 51-57.

Woolford, J.L., Jr., and Baserga, S.J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 195, 643-681.

Yano, T., Sanders, C., Catalano, J., and Daldal, F. (2005). *sacB*-5-Fluoroorotic acid-pyrE-based bidirectional selection for integration of unmarked alleles into the chromosome of *Rhodobacter capsulatus*. *Appl Environ Microbiol* 71, 3014-3024.

Ye, P., Peyser, B.D., Pan, X., Boeke, J.D., Spencer, F.A., and Bader, J.S. (2005). Gene function prediction from congruent synthetic lethal interactions in yeast. *Mol Syst Biol* 1, 2005 0026.

Yellman, C.M., and Roeder, G.S. (2015). Cdc14 Early Anaphase Release, FEAR, Is Limited to the Nucleus and Dispensable for Efficient Mitotic Exit. *PLoS One* 10, e0128604.

Yeong, F.M., Lim, H.H., Padmashree, C.G., and Surana, U. (2000). Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20. *Mol Cell* 5, 501-511.

- Yoshida, S., Asakawa, K., and Toh-e, A. (2002). Mitotic exit network controls the localization of Cdc14 to the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 12, 944-950.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282, 1721-1724.
- Zaman, S., Choudhury, M., Jiang, J.C., Srivastava, P., Mohanty, B.K., Danielson, C., Humphrey, S.J., Jazwinski, S.M., and Bastia, D. (2016). Mechanism of Regulation of Intrachromatid Recombination and Long-Range Chromosome Interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 36, 1451-1463.
- Zhang, J., Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Tang, L., Guo, Y., Oeffinger, M., Rout, M.P., Hiley, S.L., Hughes, T., and Woolford, J.L., Jr. (2007). Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev* 21, 2580-2592.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, tengo que dar las gracias a Fernando, por darme la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral en su laboratorio y bajo su dirección. Debo agradecer la dedicación y entrega que me ha mostrado durante estos años y que, sin duda, me servirán en un futuro, tanto a nivel profesional como personal.

No menos tengo que agradecer a mis compañeros, a todos los miembros de mi grupo, sin excepciones, desde los más antiguos hasta los más nuevos. Los integrantes de BM5 han dejado una huella en mí que difícilmente podré borrar. De todos vosotros he aprendido muchísimo, y quiero que sepáis que os estoy muy agradecida. Os merecéis lo mejor.

Por otro lado, mucha gente de CABIMER me ha ayudado con la realización de esta Tesis, aun no perteneciendo a mi grupo y aun no teniendo por qué ayudarme. Gracias a todos aquellos que me habéis animado o me habéis facilitado, de una forma u otra, la tarea que me proponía realizar. Gracias por mantener conmigo esas charlas durante las horas interminables de microscopía, por preguntarme qué tal me iba, por aconsejarme, por agilizarme trámites en alguna ocasión, por facilitarme el material que necesitaba para realizar los experimentos, por preocuparte de que aprovechara mis reservas, por compartir conmigo el trabajo ... en definitiva, gracias por ayudarme a que mi trabajo y estancia fuera mucho más fácil y agradable.

Al baile y a los bailarines también quiero agradecerles los ratos que hemos pasado juntos, pues como decía James Brown “Cualquier problema del mundo puede resolverse bailando”. No puedo estar más de acuerdo.

También quiero agradecerles a mis amigos, tanto fuera como dentro del mundo científico, el apoyo recibido durante todos estos años. Me fascina el entusiasmo con el que afrontáis siempre mi trabajo y cómo hacéis que me haga sentir capaz de todo. Gracias por vuestros consejos, vuestras bromas, vuestros piropos, vuestros insultos, vuestras idas de olla, vuestras historias, vuestro cariño y, sobre todo, vuestro tiempo compartido conmigo, que me ha ayudado sobremanera a la realización de esta Tesis. No hubiese sido lo que ha sido sin vosotros.

A Mara, El Chicho y La Linda también quería dedicarle un espacio en este apartado de agradecimientos, por todo lo que significáis para mí. Me habéis acompañado buena

parte de mi vida y me habéis transmitido vuestra energía y positividad.

A mi familia, la de sangre y la política, que siempre me apoya y cree en mí, independientemente de la decisión que tome, también quería transmitirle mi agradecimiento. En especial, quiero dar las gracias a mi hermano, que sin proponérselo me ha ayudado a afrontar y resolver conflictos surgidos, en especial, durante esta etapa. Tu carácter me ha ayudado a formar el mío y parte de lo que soy, de lo que pienso y cómo actúo, se deben buenamente a ti. Por supuesto, tengo que dar las gracias a mis padres, escribiría un libro infinito de los motivos que tengo para estar agradecida con vosotros, aunque me gustaría resaltar algunas cosas, como que creo que me habéis dejado el mejor de los legados: el amor por la constancia y el afán de superación. Siempre habéis trabajado mucho para conseguir vuestros objetivos, y me habéis enseñado que de este modo se logran todos. Quedo maravillada de la fortaleza que tienes, mamá, eres una mujer tan fuerte y luchadora, el espejo donde me gustaría mirarme. Durante estos años, cada vez que he sentido que me quedaba sin fuerzas, me he acordado de ti, de tu célebre frase “aprieta el culo y aguanta el tirón” y ha surtido efecto, he seguido adelante intentando que el paso fuera firme y decidido. Por tu parte, papá, eres la única persona capaz de decirme exactamente lo que necesito justo en el momento indicado, como si de palabras mágicas se tratasen. Gracias por tener esa sensibilidad, que me ha salvado en alguna ocasión. Y gracias, cómo no, a Álvaro, a quien pertenece, en realidad, gran parte de esta Tesis. Eres la persona que más ha disfrutado y sufrido conmigo durante todos estos años. Gracias por ser la brújula que señala mi camino y sin la cual me encontraría perdida y sin rumbo (ya sabes la mala orientación que tengo). Todo lo que escribiera aquí sería insuficiente para describir la ayuda que me has prestado durante este tiempo y lo agradecida que estoy por ello.

Me gustaría agradecer también a todas aquellas personas, que de algún modo, hicieron que me declinara por estudiar y contribuyeran, de forma remarcada, a mi formación. Gracias a todos esos profesores comprometidos con la enseñanza y la transmisión de conocimientos. También a aquellos que me abrieron las puertas del mundo científico y me permitieron comprobar si este me gustaba, lo cual se lo debo al departamento de Genética e Ingeniería Bioquímica de la UPO, y todos aquellos que fueron mis compañeros en el Cabd.

Igualmente, me gustaría agradecer a todas las personas que se han interesado por mi trabajo. Y a todos los que han llegado a leer hasta aquí, sin duda, muchas gracias.

